



**PCT**

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<p>(51) International Patent Classification<sup>5</sup> : <b>C07H 21/04, 21/02, C07K 13/00, C12Q 1/68</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) International Publication Number: <b>WO 94/18222</b>  (43) International Publication Date: <b>18 August 1994 (18.08.94)</b></p>
<p>(21) International Application Number: <b>PCT/US94/01360</b> (22) International Filing Date: <b>8 February 1994 (08.02.94)</b>  (30) Priority Data: <b>08/015,624 9 February 1993 (09.02.93) US</b>  (71) Applicant: <b>THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE [US/US]; 550 North Broadway, Baltimore, MD 21205 (US).</b>  (72) Inventors: <b>COFFEY, Donald, S.; 1212 Oak Croft Road, Lutherville, MD 21093 (US). PARTIN, Alan, W.; 7 Hedgeford Court, Baltimore, MD 21236 (US). GETZENBERG, Robert, H.; 244 Greens Farm Road, Branford, CT 06405 (US).</b>  (74) Agents: <b>WETHERELL, John, R. et al.; Spensley Horn Jubas &amp; Lubitz, 1880 Century Park East, Fifth floor, Los Angeles, CA 90067 (US).</b></p>		<p>(81) Designated States: <b>CA, JP, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b>  <b>Published</b> <i>With international search report.</i></p>
<p>(54) Title: <b>NUCLEAR MATRIX PROTEINS</b>  (57) Abstract  Nuclear matrix proteins (NMP) which are characterized by a defined expression in tissue are provided. These NMPs are useful markers in diagnosing and monitoring the stage of malignancy of a cell and treating cell proliferative disorders associated with the NMP. Also provided are substantially purified polypeptides and nucleotide sequences encoding the NMPs of the invention.</p>		

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-508396

(43) 公表日 平成8年(1996)9月10日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 1 2 N 15/09		9162-4B	C 1 2 N 15/00	A
A 6 1 K 31/70	ADU	8314-4C	A 6 1 K 31/70	ADU
39/395		9284-4C	39/395	D
		9284-4C		N
48/00		8314-4C	48/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 53 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平6-518284  
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)2月8日  
 (85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)8月9日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US94/01360  
 (87) 国際公開番号 WO94/18222  
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)8月18日  
 (31) 優先権主張番号 08/015,624  
 (32) 優先日 1993年2月9日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), CA, JP

(71) 出願人 ザ ジョーンズ ホプキンス ユニバーシ  
 ティー スクール オブ メディシン  
 アメリカ合衆国 21205 メリーランド州  
 バルチモア, ラットランド アベニュー  
 720番地  
 (72) 発明者 コフィー, ドナルド エス.  
 アメリカ合衆国 21093 メリーランド州  
 ルサービル, オーク クロフト ロード  
 1212番地  
 (74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核マトリックスタンパク質

(57) 【要約】

組織での明確に定められた発現により特徴づけられる核マトリックスタンパク質 (NMP) を提供する。かかる NMP は細胞の悪性度の段階を診断およびモニターし、NMP と関連した細胞増殖性疾患を治療する際の有用なマーカーとなる。また、本発明の NMP をコードする実質的に精製されたポリペプチドおよびヌクレオチド配列も提供する。

## 【特許請求の範囲】

1. NPB-1、NPB-2、NPB-3、NPB-4、NPB-5、NPB-6、NPB-7、NP-1、NP-2、NP-3、BPC-1、BPC-2、BPC-3およびPC-1より成る群から選ばれたタンパク質に特有の組織発現パターンを有する、実質的に純粋な核マトリックスタンパク質またはその機能性フラグメント。
2. 組織が尿生殖器の組織である、請求項1に記載のタンパク質。
3. 組織が前立腺の組織である、請求項2に記載の尿生殖器組織。
4. 前記タンパク質が腫瘍細胞と関連づけられる、請求項1に記載のタンパク質。
5. 前記タンパク質がBPC-1、BPC-2、BPC-3およびPC-1より成る群から選ばれる、請求項4に記載のタンパク質。
6. 腫瘍細胞が良性である、請求項4に記載の腫瘍細胞。
7. 腫瘍細胞が悪性である、請求項4に記載の腫瘍細胞。
8. 前記タンパク質が非悪性細胞と関連づけられる、請求項1に記載のタンパク質。
9. 前記タンパク質がNPB-1、NPB-2、NPB-3、NPB-4、NPB-5、NPB-6およびNPB-7より成る群から選ばれる、請求項8に記載のタンパク質。
10. 前記タンパク質が非腫瘍細胞と関連づけられる、請求項1に記載のタンパク質。
11. 前記タンパク質がNP-1、NP-2およびNP-3より成る群から選ばれる、請求項10に記載のタンパク質。
12. 請求項1のタンパク質をコードする単離精製された核酸から本質的に成るポリヌクレオチド配列。
13. 請求項12のポリヌクレオチドの少なくとも一部を含む核酸プローブ。
14. ポリヌクレオチドがDNAである、請求項12に記載のポリヌクレオチド。
15. ポリヌクレオチドがRNAである、請求項12に記載のポリヌクレオチド。

16. 請求項12のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。
17. 請求項12のポリヌクレオチドに対して相補的であるポリヌクレオチド配列。
18. 請求項12または17のポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクター。
19. ベクターがウイルスである、請求項18に記載のベクター。
20. ウイルスがRNAウイルスである、請求項19に記載のベクター。
21. RNAウイルスがレトロウイルスである、請求項20に記載のベクター。
22. ベクターがコロイド分散系である、請求項18に記載のベクター。
23. コロイド分散系がリポソームである、請求項22に記載のベクター。
24. リポソームが本質的に標的特異性である、請求項23に記載のベクター。
25. リポソームが解剖学的に標的設定 (targeting) される、請求項24に記載のベクター。
26. リポソームが機械学的に標的設定される、請求項24に記載のベクター。
27. 機械学的な標的設定が受動的である、請求項26に記載のベクター。
28. 機械学的な標的設定が能動的である、請求項26に記載のベクター。
29. リポソームが糖、糖脂質およびタンパク質より成る群から選ばれた成分とのカップリングにより能動的に標的設定される、請求項28に記載のベクター。
30. タンパク質成分が抗体である、請求項29に記載のベクター。
31. ベクターがプラスミドである、請求項18に記載のベクター。
32. 請求項1の1以上のタンパク質と結合する抗体。
33. 抗体がモノクローナルである、請求項32に記載の抗体。
34. 抗体がポリクローナルである、請求項32に記載の抗体。
35. 細胞性成分を、請求項1の1以上のタンパク質に結合する試薬と接触させることを含む、被検者における細胞増殖性疾患の検出方法。
36. 細胞増殖性疾患が尿生殖器の組織にある、請求項35に記載の方法。
37. 尿生殖器組織が前立腺である、請求項36に記載の方法。
38. 細胞性成分が核酸である、請求項35に記載の方法。
39. 核酸がDNAである、請求項38に記載の方法。

40. 核酸がRNAである、請求項38に記載の方法。
41. 細胞性成分がタンパク質である、請求項35に記載の方法。
42. 試薬がプローブである、請求項35に記載の方法。
43. プローブが核酸である、請求項42に記載の方法。
44. プローブが抗体である、請求項42に記載の方法。
45. 抗体がポリクローナルである、請求項44に記載の方法。
46. 抗体がモノクローナルである、請求項44に記載の方法。
47. プローブが検出できるように標識されている、請求項42に記載の方法。
48. 標識が放射性同位体、生物発光化合物、化学発光化合物、蛍光化合物、金属キレートまたは酵素より成る群から選ばれる、請求項47に記載の方法。
49. NPB-1、NPB-2、NPB-3、NPB-4、NPB-5、NPB-6、NPB-7、NP-1、NP-2、NP-3、BPC-1、BPC-2、BPC-3およびPC-1より成る群から選ばれたタンパク質と関連づけられる細胞増殖性疾患の治療方法であって、該疾患をもつ患者に、NPB-1、NPB-2、NPB-3、NPB-4、NPB-5、NPB-6、NPB-7、NP-1、NP-2、NP-3、BPC-1、BPC-2、BPC-3およびPC-1より成る群から選ばれたタンパク質の活性を変調(modulate)する、治療上有効な量の試薬を投与することを含む方法。
50. 試薬がアンチセンスポリヌクレオチド配列である、請求項49に記載の方法。
51. 試薬がセンスポリヌクレオチド配列である、請求項49に記載の方法。
52. 試薬が抗体である、請求項49に記載の方法。
53. 抗体がモノクローナルである、請求項52に記載の方法。
54. 細胞増殖性疾患が尿生殖器の組織にある、請求項49に記載の方法。
55. 尿生殖器組織が前立腺である、請求項54に記載の方法。
56. 宿主対象者の細胞に、請求項1のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを導入することを含む遺伝子治療法。

57. 宿主対象者の細胞にin vitroで発現ベクターを導入し、その後、形質転換細胞を宿主対象者に導入する、請求項56に記載の方法。

58. 発現ベクターがRNAウイルスである、請求項56に記載の方法。

59. RNAウイルスがレトロウイルスである、請求項58に記載の方法。

60. 対象者がヒトである、請求項56に記載の方法。

61. 細胞のNMPに作用を及ぼす組成物の同定方法であって、

a. 該組成物およびNMP含有細胞を含む成分をインキュベートし、その際、該成分に相互作用させておくのに十分な条件下でインキュベーションを行い、そして

b. 該組成物によって生じたNMPに対する作用を測定する、  
ことを含む方法。

62. 前記の作用がNMPの阻害である、請求項61に記載の方法。

63. NMPがBPC-1、BPC-2、BPC-3およびPC-1より成る群から選ばれる、請求項62に記載の方法。

64. 前記の作用がNMPの刺激である、請求項61に記載の方法。

65. NMPがNP-1、NP-2およびNP-3より成る群から選ばれる、請求項64に記載の方法。

66. 請求項1のタンパク質と関連した細胞増殖性疾患の指標となる

標的細胞性成分の検出に有用なキットであって、プローブを入れた容器を含む1以上の容器を厳重な拘束状態で受け入れるように区画化されているキャリアー手段を含んでなるキット。

67. 標的細胞性成分がポリペプチドであり、プローブが抗体である、請求項66に記載のキット。

68. 細胞性成分が核酸標的であり、プローブがポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブである、請求項66に記載のキット。

69. 標的核酸を増幅させるためのオリゴヌクレオチドプライマーを入れた容器をさらに含む、請求項68に記載のキット。

**【発明の詳細な説明】****核マトリックスタンパク質****発明の背景****1. 発明の分野**

本発明は、核マトリックスタンパク質 (nuclear matrixprotein: NMP) に関し、特に正常細胞および細胞増殖性疾患と関連した細胞において明確に定められた組織発現パターンを有する新規な核マトリックスタンパク質に関するものである。

**2. 関連技術の説明**

組換えDNA技術の進展により、増殖、発生および分化を制御する正常細胞の遺伝子 (癌原遺伝子および腫瘍抑制遺伝子) が発見されるようになってきた。ある状況下では、これらの遺伝子の調節が変化を受けて、正常細胞が腫瘍性の増殖挙動をとるようになる。いくつかの場合に、正常細胞の表現型はこれらの遺伝子に関連した種々の操作により修復することができる。これまでに、癌原遺伝子および抑制遺伝子は40以上知られており、その機能特性に応じていくつかのカテゴリーに類別される。これらには、1) 増殖因子および増殖因子受容体、2) 例えば細胞質と核の間の、細胞内シグナル伝達経路のメッセンジャー、および3) 核の内外に存在する、遺伝子発現およびDNA複製に影響を与える調節タンパク質、が含まれる。

正常細胞の寿命は、増殖能を有する未成熟期で始まり、続いて起こる分化期を通り、最後には細胞死で終わる。一方、癌は悪性

度の段階によって規定され得る多段階進行であり、そこでは正常な秩序正しい段階的進行が、おそらくは癌遺伝子、腫瘍抑制遺伝子または他の遺伝子の変異ゆえに、正常でなくなる。癌遺伝子とそれらの産物に関する研究により、癌の原因と進行のメカニズムの基本的な理解が深まり、悪性疾患を診断・治療するためのより合理的な手段が得られるようになった。

細胞の増殖および分化の制御に関連した遺伝子として、遺伝子発現およびDNA複製に影響を及ぼす調節タンパク質をコードしている遺伝子が挙げられる。こ

これらの遺伝子の大半の遺伝子産物は核の中にあり、多くはDNA結合タンパク質である。動物細胞の核は、クロマチン（染色質）と呼ばれる、タンパク質と結合して複合体を形成している細胞DNAを含んでいる。クロマチンは核マトリックスと呼ばれる核の内部骨格によって構成される。DNAと関連した核マトリクスタンパク質（NMP）は、細胞での遺伝子発現の調節においてある役割を果たしている増殖／分化調節タンパク質でありうる。増殖調節機構を失っている細胞では、核特異的タンパク質が遺伝子の転写プロモーター領域を活性化し続けて、その遺伝子の過剰発現を引き起こすと想定される。同様に、種々の癌原遺伝子の発現を制御または抑制するサプレッサーとして機能する核タンパク質は、過少発現されるかまたは変異型で発現され、その結果、さもなくば抑制される遺伝子の異常発現を可能とする。

最近の癌検査は一般的に非特異的で、感度が低く、そのため臨床用途が限られている。例えば、癌の診断とモニターの両面で広く採用されている生化学的検査は癌胎児性抗原（CEA）のレベ

ルを測定するものである。CEAは胎児組織では大量に検出されるが、正常な成人組織では少量しか検出されない胎児腫瘍性抗原である。ある種の消化器系癌をもつ患者の血清は、免疫学的方法で測定しうる高レベルのCEAを含んでいる。血清中のCEAの量はこれらの腫瘍の鎮静化または再発と相関関係があり、腫瘍を外科的に摘出した後ではそのレベルがいきなり低下する。CEAレベルが再度上昇することは悪性細胞の復帰を意味する。しかし、CEAはほぼ全ての成人に低レベルで存在する普通の糖タンパク質でもある。さらに、このタンパク質はいくつかの非悪性状態でも上昇することがあり、多くの癌の存在下では上昇しない。それゆえ、癌マーカーとしては理想に程遠いものである。

同様の胎児腫瘍マーカーとしてはアルブミンの胚型である $\alpha$ -フetoプロテインがある。この抗原も胚組織で多量に検出されるが、正常な成人では少量しか検出されない。これは肝癌を含めて多くの消化器系悪性疾患において上昇する。CEAと同様に、その低下は癌の鎮静化に、その再上昇は再発に関係がある。2、3の選ばれた症例以外のどの症例においても、このマーカーを悪性疾患のスクリ



ーニングや以前に診断を下された癌のモニタリングに使用するには、感度と特異性が不十分である。

上述したことを考慮すると、より効果的な診断、予後および治療法を可能にするような、新しい癌マーカーの必要性が依然存在している。正常細胞と癌細胞における遺伝子発現または細胞構造の調節に関係しているNMPの同定は、細胞の悪性度の段階を確認するための理想的なマーカーを提供するであろう。

### 発明の概要

本発明は、細胞の異常な増殖および悪性度のさまざまな段階で明確に定められた組織発現パターンを有する新規な核マトリックスタンパク質（NMP）の発見に基づくものである。本発明のNMPは、タンパク質NPB-1、NPB-2、NPB-3、NPB-4、NPB-5、NPB-6、NPB-7、NP-1、NP-2、NP-3、BPC-1、BPC-2、BPC-3およびPC-1のいずれか1つに特徴的な組織発現パターンにより明確に定められる。これらのタンパク質は、初めに、正常な前立腺組織（NP）、正常および良性の両方の過形成前立腺組織（NBP）、良性の過形成前立腺組織および癌性の前立腺組織（BPC）または前立腺癌組織（PC）に関連があるとして同定された。

本発明は、新規なNMPをコードしているヌクレオチドを提供する。本発明のNMPは、細胞性成分とNMPに結合する試薬とを接触させることからなる被検者における細胞増殖性疾患の検出方法の基礎を提供するものである。この方法は尿生殖器系の組織、特に前立腺組織、の細胞増殖性疾患を検出するのに特に有用である。

本発明はまた、NPB-1、NPB-2、NPB-3、NPB-4、NPB-5、NPB-6、NPB-7、NP-1、NP-2、NP-3、BPC-1、BPC-2、BPC-3およびPC-1に関連した細胞増殖性疾患の治療方法を提供する。こうした方法は例えば遺伝子治療を含みうる。

### 図面の簡単な説明

図1は、正常ヒト前立腺（A）、良性前立腺過形成（B）および前立腺癌（C）

)の核マトリックスタンパク質の組成を示す。大きな矢印(パネルA):いろいろなタイプの組織に一貫しないで存在していたタンパク質類の可変グループ。小さな矢印:すべての組織において一貫して変化しており、表1で分子量および等電点により同定されるタンパク質。略号:LA-ラミンA、LB-ラミンB、LC-ラミンC、A-アクチン、NP-正常な前立腺、NPB-正常な前立腺およびBPH、BPC-BPHおよび前立腺癌、PC-前立腺癌、kD-1,000の位の分子量、SDS-PAGE-ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、およびpI-等電点。

図2は、BPHと前立腺癌に特異的な核マトリックスタンパク質を示す。正常な前立腺、BPHおよび前立腺癌の主な組織特異的核マトリックスタンパク質の概略図。略号:kD-1,000の位の分子量、SDS-PAGE-ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、pI-等電点、およびBPH-良性の前立腺過形成。

図3は、正常な前立腺(正常)から良性の前立腺過形成(BPH)への、または前立腺癌(癌)への多段階進行の2つのモデルを示す。モデルIは、同様の現象が両方の経路で起こることを予告するものである。モデルIIは、正常から、癌へ進行する場合のBPHへ、進行するときに起こる異なる現象を予告するものである。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、実質的に純粋な核マトリックスタンパク質(NMP)またはその機能性フラグメントを提供する。該タンパク質はNPB-1、NPB-2、NPB-3、NPB-4、NPB-5、NPB-6、NPB-7、NP-1、NP-2、NP-3、BPC-1、BPC-2、BPC-3およびPC-1より成る群から選ばれたタンパク質に特徴的な組織発現パターンを有する。本発明はまた、これらのタンパク質をコードしているポリヌクレオチド配列を提供する。本発明のNMPは、一般に、細胞増殖性疾患の特定の時期に細胞内に存在する点に特徴がある。

「細胞増殖性疾患」という用語は、悪性細胞集団ばかりでなく、しばしば形態

と遺伝子型の両方が周囲の組織と違っているように見える非悪性細胞集団をも表す。悪性疾患（すなわち、癌）は多段階進行であり、本発明のタンパク質は正常細胞から癌細胞へ移行する際に3つの広範な段階と関係している。広範な段階において、正常組織（段階1）は過形成（段階2）の徴候を示し始めるか、または新形成（段階3）の徴候を示す。本明細書中で用いる「過形成（hyperplasia）」とは、組織において異常な増殖または異常な配列を示す細胞のことである。用語「過形成」に含まれるものは、良性腫瘍などの良性の細胞増殖性疾患である。正常組織と良性過形成組織（NPB）（非悪性）の両方において組織発現パターンを示す本発明のタンパク質としては、NPB-1、NPB-2、NPB-3、NPB-4、NPB-5、NPB-6およびNPB-7がある。「組織発現パターン」という用語は、当業者が普通に用いる方法（例えば、SDS-ポリアクリルアミドゲ

ル電気泳動）によって検出され得るレベルでのNMP遺伝子の遺伝子産物の合成を意味する。本明細書中で用いる「新形成（neoplasia）」とは新たな異常増殖を指し、腫瘍をもたらすことである。過形成と違って、新形成増殖はもとの刺激物の不在下でさえも持続し、制御不能で進行性である点に特徴がある。悪性新生物つまり悪性腫瘍は良性腫瘍と区別され、前者は退形成（anaplasia）の度合がより大きく、侵入および転移の性質を有する。本発明のタンパク質PC-1は、悪性新生物に見られる発現パターンを有するタンパク質の例である。本発明のタンパク質BPC-1、BPC-2およびBPC-3は良性の過形成組織または腫瘍において、さらに新形成組織または腫瘍でも発現されるタンパク質の例である。一方、タンパク質NP-1、NP-2およびNP-3は正常組織（非腫瘍）、非過形成組織および非新形成組織において組織発現パターンを有する。したがって、これら後者のタンパク質の存在は本質的に細胞増殖性疾患の存在を問題外とする。

要するに、BPC-1、BPC-2およびBPC-3、それにPC-1は腫瘍細胞と関係があり、NPB-1、NPB-2、NPB-3、NPB-4、NPB-5、NPB-6およびNPB-7は正常および非悪性の過形成または腫瘍細胞

と関係があり、PC-1は悪性細胞と関係があり、そしてNP-1、NP-2およびNP-3は非腫瘍細胞と関係がある。「と関係がある」という用語は、タンパク質の発現パターンと癌への進行段階との相関関係を意味する。

本発明は実質的に純粋なNMPまたはその機能性フラグメント

を提供する。本明細書中で用いる「機能性ポリペプチド」または「機能性フラグメント」という用語は、規定された機能検査により同定される生物学的機能または活性を保有し、かつ細胞の特定の生物学的変異、形態学的変異または表現型の変異と関係があるポリペプチドを指す。生物学的機能を保有するポリペプチドフラグメントは、抗体分子が結合し得るエピトープほどに小さなものから、細胞内の表現型変化の特徴的な誘導またはプログラミングに関与しうるポリペプチドほどに大きなものまで、様々である。本発明のNMPの全体または機能性部分をコードしている機能性ポリペプチドは、それらが核マトリックス中に見いだされて本発明の所与のNMPに特有の組織発現パターンを示す限り、どれも本発明に含まれることが理解されよう。「機能性ポリヌクレオチド」とは、ここに記述する機能性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのことである。

「実質的に純粋な」または「単離された」という用語は、本質的に他のポリペプチドまたは他の遺伝子を含まない、それぞれ本発明のNMP機能性ポリペプチドまたは該NMP機能性ポリペプチドをコードする遺伝子を意味し、自然界で通常一緒に存在している他の汚染物質や、自然界では見られない形で存在するような汚染物質を本質的に含まない。本発明はまた、本発明のNMPの機能性誘導体を提供する。「機能性誘導体」とは、分子の「フラグメント」、「変異体」、「類似体」または「化学的誘導体」を意味する。本発明のDNAまたはアミノ酸配列のような分子の「フラグメント」は、該分子のヌクレオチドまたはアミノ酸サブセットを含む。かかる分子の「変異体」は、完全な分子またはそ

のフラグメントに実質的に類似している天然に存在する分子のことである。分子の「類似体」は、完全な分子またはそのフラグメントに実質的に類似している非天然分子のことである。

本発明のNMPを単離するために用いられる方法は、例えばタンパク質用の通常の沈殿剤によるNMP含有試料の処理、これに続くイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、限外濾過およびこれらの種々の組合せのような分画化技法を含む、タンパク質物質の分離に常用されている方法である。NMPは、例えば米国特許第4,885,236号および同第4,882,268号に記述される方法により細胞浮遊液から精製することができる。本発明のポリペプチドの他の精製法は当業者には知られているだろう（例えば、参考としてここに組み入れるCurrent Protocol in Immunology, Coliganら編集, 1992を参照のこと）。

NMP含有画分は適当な条件下でSDS PAGEにかけ、NMP活性を含むゲル切片または対象のNMPの分子量に対応するゲル切片を回収する。SDS PAGEはLaemmliらの方法（Nature, 227:680, 1970）にしたがって実施できるが、当技術分野で公知の技法である。適当な範囲内にある条件の変更はこの精製法に含まれることが理解されよう。

SDS PAGEからのNMP含有画分は逆相HPLCにかけ、例えばアセトニトリルを用いて溶出する。得られたNMPは実質的に純粋で、N末端のアミノ酸配列解析が可能である。この溶液を減圧下で乾燥し、少量のアセトニトリル95%+TFA（0.08%）中に再溶解する。その後、濃厚な試料をフェニルチオヒ

ダントイン（PTH）分析装置に接続したシーケンサーに導入する。

本発明は、新規なNMP機能性ポリペプチドをコードするDNA、cDNA、RNAのようなポリヌクレオチドを提供する。本発明のNMPの全体または機能性部分をコードするポリヌクレオチドは、それらが核マトリックス中に見いだされて本発明の所与のNMPに特有の組織発現パターンを示す限り、どれも本発明に含まれることが理解されよう。このようなポリヌクレオチドとしては、天然に存在するポリヌクレオチドと、故意に操作した、例えば突然変異誘発を行ったポリヌクレオチドが含まれる。

NMPのポリヌクレオチド配列には、アンチセンス配列および遺伝暗号の結果

としての縮重配列も含まれる。天然アミノ酸は20種類存在しているが、そのうちの大半は1より多いコドンにより特定される。それゆえ、NMPのアミノ酸配列が機能性ポリペプチドをもたらすのであれば（少なくとも、センスポリヌクレオチド鎖の場合）、全ての縮重ヌクレオチド配列は本発明に包含される。アンチセンスポリヌクレオチドが関係している場合には、本発明はNMPポリペプチドの生産を阻害することができる全てのアンチセンスポリヌクレオチドを包含する。

本発明のDNA配列はいくつかの方法によって得ることができる。例えば、DNAは当技術分野で公知のハイブリダイゼーション技法を用いて単離することができる。これらには、1) 共有しているヌクレオチド配列を検出するためのゲノムまたはcDNAライブラリーへのプローブのハイブリダイゼーション、2) 共有している構造的特徴を検出するための発現ライブラリーの抗体ス

クリーニング、および3) ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による合成が含まれるが、これらに限らない。本発明のRNA配列は当技術分野で公知の方法により得られる（例えば、参考としてここに組み入れるCurrent Protocols in Molecular Biology, Ausubelら編集, 1989を参照のこと）。

本発明のNMPをコードしている特定DNA配列の開発は、(1) ゲノムDNAからの二本鎖DNA配列の単離、(2) 対象ポリペプチドの必要なコドンを提供するDNA配列の化学的製造、および(3) 真核ドナー細胞から単離されたmRNAの逆転写による二本鎖DNA配列のin vitro合成、によって得ることができる。後者の場合には、mRNAの二本鎖DNA相補体が最終的に形成され、これは一般的にcDNAと呼ばれている。組換え法で用いる特定DNA配列を開発するためのこれら3つの方法のうち、ゲノムDNA単離物の単離が最も一般的でない。このことは、イントロンの存在のために哺乳動物ポリペプチドの微生物発現を得ることが望ましい場合に、特に当てはまる。

DNA配列の合成は、目的のポリペプチド産物のアミノ酸残基の全配列が知られているときには、しばしば最良の方法となる。

目的のポリペプチド産物のアミノ酸残基の全配列が不明である場合は、DNA配

列の直接合成が実施できず、cDNA配列の作製が最良の方法となる。対象のcDNA配列を単離するための標準方法の中に、ドナー細胞（高レベルの遺伝子発現を有する）に豊富に存在しているmRNAの逆転写により誘導されるプラスミド担持cDNAライブラリーの作製がある。ポリメラーゼ連鎖反応の技法と併用すると、稀少発現産物でさえもクローニングするこ

とができる。ポリペプチドのアミノ酸配列のかかりの部分が知られている場合には、標的cDNA中に推定上存在する配列と重複する一本鎖または二本鎖の標識DNAまたはRNAプローブ配列の作製を、DNA/DNAハイブリダイゼーション法（一本鎖形態に変性されたcDNAのクローン化コピーに対して実施される）において採用できるかもしれない（Jayら, *Nucleic Acid Research*, 11: 2325, 1983）。

ハイブリダイゼーション法は、それぞれのプローブが、変性二本鎖DNAの異種混合物を含むハイブリダイゼーション試料中の特異的DNA配列に完全に相補的である可能性をもつ場合、標識した混合合成オリゴヌクレオチドプローブを用いて組換えクローンをスクリーニングするのに有用である。そのようなスクリーニングのためには、一本鎖DNAまたは変性二本鎖DNAを用いてハイブリダイゼーションを行うことが望ましい。ハイブリダイゼーションはとりわけ、問題としているポリペプチドに関係するmRNAの量がきわめて少ない供給源材料に由来するcDNAクローンの検出に有用である。非特異的な結合を避けるための厳格な（ストリンジェント）ハイブリダイゼーション条件を用いることによって、たとえば、混合物中に存在する、標的DNAに対するただ一つの完全な相補的プローブに対する標的DNAのハイブリダイゼーションによって、特異的cDNAのクローンのオートラジオグラフィによる可視化が可能となる（Wallaceら, *Nucleic Acid Research*, 9: 879, 1981）。

NMP含有cDNAライブラリーは、さまざまなcDNAを卵母細胞に注入し、cDNA遺伝子が発現して産物が生産されるための十分な時間を与え、たとえばNMPポリペプチドに対する特異的な抗体、あるいはNMP活性に対する機能

的なアッセイおよびNMPに特徴的な組織の発現パターンを用いることによって、目的とするcDNAの発現産物の存在を検証することによってスクリーニングを行うことができる。

核酸のハイブリダイゼーションに依拠したスクリーニング法は、適当なプローブが利用できる限りはいかなる生物のいかなる遺伝

子配列をも単離することを可能にする。問題とするタンパク質をコードする配列の一部に対応するオリゴヌクレオチドプローブは、化学的に合成することができる。これはアミノ酸配列の短いオリゴペプチド領域が知られていなければならないことを要求する。タンパク質をコードするDNA配列は遺伝子暗号から推論されるが、遺伝暗号の縮重を考慮に入れなければならない。配列が縮重している場合には変性二本鎖DNAの異種混合物を利用した混合添加反応を行うことが可能である。そのようなスクリーニングのためには、ハイブリダイゼーションは一本鎖DNAまたは変性二本鎖DNAを用いて行うことが望ましい。

本発明の新規なDNA配列は本質的にNMPの全部または一部をコードするので、サブクローンを調製し、このDNAまたは対応するDNA配列からより小さなポリペプチド断片を発現させるのは、ごくふつうに行われることである。あるいは、ここに開示した本発明の独自のNMP種を定めるDNA断片を用いることによって、知られている技術と結びつけて、全NMPをコードするDNA配列を決定することが可能である。そのような技術は米国特許第4,394,443号および米国特許第4,446,235号に述べられており、文献内容は参考としてここに組み入れる。

ラムダgt11のようなcDNA発現ライブラリーは、NMPに対する特異的な抗体を用いて、少なくとも一つのエピトープを有するNMPペプチドに対して間接的にスクリーニングを行うことができる。そのような抗体はポリクローナル由来でもモノクローナル由来でもよく、NMP cDNAの存在を示す発現産物を検出するのに用いられる。

ポリクローナル抗体は動物、たとえばウサギを免疫原性のあるNMP標品によ



って免疫し、つづいて当業者にはよく知られた方法によって抗体の精製を行うことにより調製される。

本発明に用いられた抗体は本発明のNMPと免疫反応性をもつ。基本的に異なるエピトープ特異性をもつモノクローナル抗体の集合よりなる抗体と、明確に異なるモノクローナル抗体標品の両方が提供される。モノクローナル抗体はタンパク質の抗原含有断片を用い、当技術分野でよく知られている方法 (Kohrerら, Nature, 256:195, 1975; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., 1989) によって作られる。

本発明の抗体は、本発明のNMPを含む配列の単離のためのイムノアフィニティークロマトグラフィーに用いることができる。そのようなイムノアフィニティークロマトグラフィーを用いる一つの方法は、本発明の抗体をCNBrセファロースー4BまたはTresyl活性化セファロース (Pharmacia) に結合させることである。これらの固相結合抗体は、次いでその他のタンパク質を含む混合物からNMPを含む配列を特異的に結合し、この配列の単離精製を可能にする。結合したNMP配列は当業者にはよく知られている技術、たとえばカオトロピック試薬、低pH、または尿素などを用いて、アフィニティークロマトグラフィーの支持体から溶出することができる。

NMPのDNA配列はNMPをコードするゲノミックなポリヌクレオチドの増幅のためのプライマーであるオリゴヌクレオチドを用いて作製できる。これらの独特のオリゴヌクレオチドプライマーの作製はNMPをコードするポリヌクレオチドに隣接するフ

ランキング領域の同定にもとづいて行われる。これらのオリゴヌクレオチドプライマーは、NMPポリペプチドをコードする配列のフランキングヌクレオチドおよびこれに相補的な配列とハイブリダイゼーションを行うことのできる配列を含む。

本発明のプライマーは、NMPをコードするポリヌクレオチドのなかの相当量の核酸の重合の特異的な開始を可能にさせるような、十分な長さで適当な配列をもったオリゴヌクレオチドを含む。特に、ここで用いられている「プライマー」

という用語は、NMP鎖に実質的に相補的なプライマー伸長反応生成物の合成を開始させることのできる、二つまたはそれ以上、望ましくは三つ以上のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含む配列のことを意味する。合成のための実験的条件はヌクレオチド三リン酸およびDNAポリメラーゼなどの重合と伸長のための試薬、および適当な温度およびpHを含む。プライマーは増幅の効率を最大にするために一本鎖であることが望ましいが、二本鎖でもよい。二本鎖の場合には、プライマーは伸長反応生成物を調製するために用いる前に、二つの鎖を分離する処理をうける。プライマーとして望ましいのはオリゴデオキシリボヌクレオチドである。プライマーの長さは、ヌクレオチドの重合と伸長を誘導する試薬の存在下で、伸長生成物の合成を開始させるのに十分な長さをもたねばならない。プライマーの正確な長さは、温度、緩衝液、およびヌクレオチド組成などを含む多くの要素によって左右される。オリゴヌクレオチドプライマーは、より少ないヌクレオチドを含むものであってもよいが、典型的な15~22またはそれ以上のヌクレオチドを含む。

本発明のプライマーは、増幅をうけるべきNMPをコードするポリヌクレオチドの各鎖に「実質的に」相補的であるように設計されている。これはプライマーが重合とヌクレオチド伸長の試薬が働きうる条件で、その対応する鎖とハイブリダイゼーションを行うのに十分な相補性をもつことを意味する。言葉をかえれば、プライマーはフランキング配列とハイブリダイゼーションを行うのに十分な相補性を持ち、レセプターNMPをコードするポリヌクレオチドの増幅を許すものでなければならない。望ましいのはプライマーがフランキング配列鎖と正確な相補性をもつことである。

本発明のオリゴヌクレオチドプライマーは、含まれている反応段階の数に相当する、NMPをコードするポリヌクレオチドの指数的な量を生成する酵素的な連鎖反応である、増幅過程に用いられる。典型的には一つのプライマーは、NMPをコードするポリヌクレオチドの負（-）鎖に対して相補的であり、もう一方は正（+）鎖に対して相補的である。変性させた核酸に対するプライマーのアニールリングに続く、たとえばDNAポリメラーゼIの大フラグメント（Klenow）など

の酵素とヌクレオチドによる伸長反応により、NMP配列を含む、新しく合成された(+)および(-)鎖が生じる。これら新しく合成された配列はまた鋳型ともなるので、変性、プライマーアニーリング、伸長反応のサイクルの繰返しにより、プライマーによって両端の区切られた配列(すなわちNMPポリヌクレオチド配列)の指数的な生成がはかられる。連鎖反応の生成物はその末端が用いられた特異的なプライマーの末端に対応する、ばらばらの核酸二本鎖となる。この分野の専門家

は、標的核酸のコピー数を増加させるために利用される、他の増幅手段があることも知るであろう。これら0、例えば、連結活性化転写(ligation activated transcription: LAT)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、鎖置換活性化(strand displacement activation: SDA)などを含むが、PCRが望ましい方法である。

本発明のオリゴヌクレオチドプライマーは、通常ホスホトリエステルおよびホスホジエステル法またはこの自動化法など、適当な方法を用いて調製することができる。そのような自動化法の一例として、ジエチルホスホルアダイトが出発材料として用いられ、Beaucageら(Tetrahedron Letters 22: 1859-1862, 1981)に述べられたように合成することができる。改質固層支持体上におけるオリゴヌクレオチド合成の一方法は、米国特許第4,458,066号に述べられている。本発明に従って用いることのできる増幅の一方法は米国特許第4,683,202号および同第4,683,195号に述べられているポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である。

本発明のNMPの特異的な核酸の配列を含むか、または含んでいると考えられる限り、精製または未精製形態の、いかなる核酸標本も上記方法のための出発核酸として用いることができる。したがってこのプロセスは、たとえばDNAまたはRNA(mRNAを含む)を用いることができるが、ここでDNAまたはRNAは一本鎖または二本鎖のいずれでもよい。RNAが鋳型として用いられる場合は、鋳型をDNAへと逆転写するために至適の酵素および/または条件が用いられる。さらに、それぞれの一方の鎖を含むDNA-RNAハイブリッドを用いることができる。核酸の混合物もまた用いることができ、あるいは同一の、または異なる

るプライマーを用いた、ここでさきに述べた増幅反応で生成した核酸も用いられる。増幅されるべき特定の核酸配列（すなわちNMP配列）は、大きな分子の分画であるかもしれず、または、特定配列が核酸全体の配列を構成するようにはじめにばらばらの分子として存在しうる。増幅すべき配列がはじめに純粋なかたちで存在する必要はないから、それはヒト全DNAに含まれているような複雑な混合物の微量成分であってもよい。

ここで用いられるDNAまたはRNAは、前立腺組織またはその他のさまざまな組織などの身体標本からManiatisら (Molecular Cloning, 280: 281, 1982) によって述べられた方法などの、さまざまな技術によって抽出されうる。抽出された試料が不純（例えば血漿、血清、精液または血液など）な場合には、これは増幅を行う前に試料の細胞、体液、組織または動物細胞膜などをばらばらにし、核酸鎖を露出および／または分離させるのに有効な試薬の量を用いて処理することができる。鎖を露出させ分離させる、溶解と核酸の変性の段階は、増幅をより容易に行わせることを可能にする。

試料の標的核酸配列が二本の鎖を含む場合、これを鋳型として用いる前に核酸の鎖を分離する必要がある。鎖の分離は独立の段階として、またはプライマー伸長生成物の合成と同時に行うことができる。この鎖の分離は、物理的、化学的、または酵素的な手段を含む、さまざまな適当な変性条件を用いて行うことができる。「変性」という用語はそのようなすべての方法を含んでいる。核酸二本鎖を分離する一つの物理的方法は、これが変性するまで核酸を加熱することを含む。典型的な熱変性は、約80°Cから105°C

の温度範囲で約1分から10分間の処理を含む。鎖の分離はまた、ヘリカーゼとして知られる酵素群または、ヘリカーゼ活性を有し、リボATPの存在下でDNAを変性することが知られているRecA酵素によって誘導することができる。ヘリカーゼによる核酸の鎖の分離に適当な反応条件はKuhn Hoffmann-Berling (CSH-Quantitative Biology, 43: 63, 1978) によって記述されており、RecAを用いる技術についてはC. Radding (Ann. Rev. Genetics, 16: 405-437, 1982) に総説がある。

増幅を行うべき配列を含む核酸が一本鎖ならば、その相補的な鎖は一つまたは二つのオリゴヌクレオチドプライマーを加えることによって合成される。単一のプライマーが用いられる場合には、プライマー、重合のための試薬、および後述の4種類のヌクレオチド三リン酸の存在下でプライマー伸長反応生成物が合成される。生成物は一本鎖核酸に部分的に相補性があり、一本鎖核酸とハイブリダイズして鎖の長さが等しくない二本鎖を形成し、これは次いで一本鎖に分けられ、二本の分離した相補的な一本鎖を生じる。あるいは二つのプライマーを一本鎖の核酸に加え、既述のように反応を行わせてもよい。

核酸がもともと一本鎖であったか二本鎖であったかには無関係に、核酸の相補的な鎖が分離されると、分離した鎖はもう一本の鎖の合成のための鋳型として直ちに用いられうる状態にある。この合成はプライマーの鋳型へのハイブリダイゼーションが生ずる条件下で行われる。一般に合成は、水性の緩衝液中で生じ、望ましいpHは7~9であり、最も望ましいのは約8である。モル過剰の（ゲノミックな核酸にたいしては通常プライマー：鋳型=約

10<sup>8</sup> : 1) の二つのオリゴヌクレオチドプライマーを、分離した鋳型鎖を含む緩衝液に加えるのが望ましい。しかし、本発明の方法が診断への応用に用いられる場合には、相補的な鎖の量が未知でありうるので、相補的な鎖に対するプライマーの相対量を確実に決定することはできない。しかし、実際問題として増幅されるべき配列が複雑で長い核酸鎖の混合物の一部に含まれている場合には、加えるプライマーの量は相補的な鎖（鋳型）の量よりも一般的にモル過剰である。このプロセスの効率を上げるためには大モル過剰であることが望まれる。

デオキシリボヌクレオチド三リン酸、dATP、dCTP、dGTPおよびdTTPを、プライマーと別々にまたはプライマーと共に適量を合成混合物中に加え、生じた溶液を約90~100℃でおよそ1~10分間、望ましくは1~4分間加熱する。この加熱後、溶液の温度をプライマーのハイブリダイゼーションに適当な室温にまで下げる。冷えた溶液に、プライマー伸長反応に影響をあたえる適当な試薬（ここでは“重合試薬”と呼ぶ）を加え、反応を当業界で知られた条件下で行わせる。重合試薬は熱に安定であれば他の試薬とともに添加してもよい。この

合成（または増幅）反応は室温から、それ以上の温度では重合試薬が働かなくなるまでの温度で生じる。したがってたとえば、DNAポリメラーゼがこの試薬として用いられた場合、温度は一般に40℃以下である。温度は通常室温が用いられる。

重合試薬は酵素を含め、プライマー伸長生成物の合成を行わせる機能をもつものである。どのような化合物またはシステムでもよい。この目的に適した酵素は、たとえば熱安定性の酵素（すなわ

ち、変性を行わせるのに十分な高さに上昇させた温度に曝されたのちにプライマー伸長反応を行う酵素）を含み、大腸菌DNAポリメラーゼ I、大腸菌DNAポリメラーゼ I のKlenow断片、T4 DNAポリメラーゼ、他の利用可能なDNAポリメラーゼ、ポリメラーゼ変異タンパク質、逆転写酵素、その他の酵素などを含む。適当な酵素はヌクレオチドを適当に結合させ、NMP核酸鎖に相補的なプライマー伸長生成物を形成するのを助ける。一般的に、この合成は各プライマーの3'末端ではじまり、異なる長さの分子を生成しつつ合成が終結するまで、鋳型鎖に沿って5'方向に進行する。しかし、上に述べたのと同じの方法を用いて、合成が5'側で開始し、反対方向に進行するような重合試薬もありうる。

新しく合成されたNMP鎖およびその相補的な核酸鎖は上に述べたハイブリダイゼーション条件下で二本鎖分子を形成し、このハイブリッドはこのプロセスの次の段階に用いられる。次の段階では、この新しく合成された二本鎖DNAはさきに述べた方法のいずれかの方法を用いた変性条件に曝し、一本鎖分子を生じさせる。

上記プロセスは一本鎖分子について繰り返される。上に述べた条件下で反応を進行させるために、さらに重合試薬、ヌクレオチド、およびプライマーを加えることができる。ふたたび、この合成は各オリゴヌクレオチドプライマーの一端から開始し、鋳型的一本鎖に沿って進行しもう一本の核酸鎖を生む。この段階の後、伸長生成物の半分は二つのプライマーで区切られた特定の核酸配列より成るであろう。

変性および伸長生成物の合成の段階は、検出に必要な程度まで、NMP核酸配

列の増幅に必要なだけ何度も繰り返すことができ

る。生じた特定核酸の量は指数的に蓄積することになる。

本発明の方法により増幅を行った配列は、PCR、オリゴマー制限 (Saikiら, Bio/Technology, 3:1008-1012, 1985)、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド (ASO) プローブ分析 (Connerら, Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 80:278, 1983)、オリゴヌクレオチド連結試験 (OLA) (Landegrenら, Science, 241:1077, 1988) その他のような特定のDNA配列の検出に通常用いられる方法のいずれかによって、溶液中、または固体支持体に結合後、さらに評価、検出、クローニング、配列解析を行うことができる。

NMPをコードするDNA配列は、DNAを適当な宿主細胞に移入することによってin vitroで発現させることができる。“宿主細胞”はベクターが増殖継代され、そのDNAが発現する細胞である。この用語はさらに検体宿主細胞の子孫細胞も含む。複製の過程で変異が生じる可能性があるので、すべての子孫細胞は親細胞と同一でないかもしれないことが考えられる。しかし、そのような子孫細胞も“宿主細胞”という用語が用いられるときには含まれている。安定した移入、言葉を変えれば外来DNAが宿主内で継続的に保持される場合の方法は当業界で知られている。

本発明において、NMPポリヌクレオチド配列を組換え発現ベクターに挿入することができる。“組換え発現ベクター”という用語は、NMP核酸配列の挿入または組み込みにより操作された、当業界で知られているプラスミド、ウイルスまたは他の運搬体をさす。そのような発現ベクターは宿主の挿入された核酸配列の効率のよい発現を促進するプロモーター配列を含む。この発現ベ

クターは典型的には、複製起点、プロモーターおよびトランスフォームされた細胞の表現型による選択を可能にする特定遺伝子を含む。本発明における使用に適切なベクターは以下に限るものではないが、バクテリアにおける発現のためのT7系発現ベクター (Rosenbergら, Gene 56:125, 1987)、哺乳動物細胞における発現のためのpMSXND発現ベクター (Lee and Nathans, J. Biol. Chem.

263:3521, 1988) および昆虫細胞における発現のためのバキュロウイルス誘導ベクターなどを含む。DNAセグメントはベクター中で、調節要素たとえばプロモーター (たとえばT7、メタロチオネインI、またはポリヘドリンプロモーターなど) と機能的に連結して存在しうる。

NMPをコードするポリヌクレオチド配列は原核生物または真核生物のいずれかのなかでも発現させうる。宿主として微生物、酵母、昆虫および哺乳動物などを含みうる。原核生物中における真核生物またはウイルス配列をもつDNA配列の発現の方法は当業者間にはよく知られている。宿主中の発現および複製が可能な生物学的に機能をもつウイルスおよびプラスミドDNAは当業者には知られている。そのようなベクターは本発明のDNA配列を組み込むために用いられる。

組換えDNAによる宿主細胞のトランスフォーメーションは当分野の専門家にはよく知られている、通常の技術によって実施することができる。宿主が大腸菌などの原核細胞である場合には、DNAのとり込み能力のあるコンピテント細胞は、対数増殖期の後に集菌し、ひきつづいてCaCl<sub>2</sub>法によって処理するという、当業者にはよく知られた方法により調製することができる。この代

りにMgCl<sub>2</sub>またはRbClを用いてもよい。トランスフォーメーションは宿主細胞のプロトプラストを形成した後、またはエレクトロポレーションによって行うこともできる。

宿主が真核生物である場合、リン酸カルシウム共沈殿などのDNAのトランスフェクション法、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどの通常の機械的方法、リボソームに封入したプラスミドの挿入またはウイルスベクターなどを用いることができる。真核生物細胞はまた本発明のNMPをコードするDNA配列、およびヘルペス・シンプレックス・チミジンキナーゼ遺伝子など選択に使える表現型をコードする第二の外来DNA分子によって同時にトランスフォームすることができる。もう一つの方法はシミアンウイルス40 (SV40) またはウシパピローマウイルスなどの真核生物ウイルスベクターを用いて、真核細胞を一時的に感染またはトランスフォームさせてタンパク質を発現させる方法である。(Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed.)



、1982)。

本発明が提供する微生物を用いて発現させたタンパク質またはその断片の単離と精製は、調製用クロマトグラフィーおよびモノクローナルまたはポリクローナル抗体を含む免疫学的分離法などを含む、通常の方法によって行うことができる。本発明で提供される抗体はNMPポリペプチドおよびその断片と免疫反応性をもつ。

本発明のNMPポリペプチドはポリペプチドの断片および保存的な変異を含む。NMPの一次アミノ配列配列の小さな改変は、ここで述べられているNMPポリペプチドに比較して実質的に等

しい活性をもつタンパク質を生じうる。そのような改変は部位特異的突然変異誘発によるように意図的なものであることも、自然発生的なこともある。これらの改変で生じるすべてのポリペプチドは、NMPの生物学的活性が存在する限り、本発明に含まれる。さらに、一つまたはそれ以上のアミノ酸の欠失も、その生物学的活性を大きく変えることなしに、生じる分子の構造の改変をもたらす。これはより広い用途をもったより小さい活性分子の開発に結びつく。

ここで用いられる“保存的な変異”という用語はアミノ酸残基を別の、生物学的に類似の残基で置換することを意味する。保存的な変異の例は、イソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニンなどの一つの疎水性残基を別の疎水性残基で置換すること、またはアルギニンをリジンで、グルタミン酸をアスパラギン酸で、またはグルタミンをアスパラギンで、さらに類似の方法で置換するような一つの極性残基を別の極性残基で置換することを意味する。

本発明のペプチドは、Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149, 1962) および Stewart and Young, Solid Phase Peptides Synthesis (Freeman, San Francisco, 1969, pp. 27-62) に述べられている、0.1~1.0mMolアミン/gポリマーを含むコポリ (スチレンージビニルベンゼン) を用いた、よく知られた固相ペプチド合成法によって合成できる。化学合成の完了に際して、ペプチドは液体HF-10%アニソールで0℃約<sup>1</sup>/<sub>4</sub>~1時間処理することにより脱保護され、ポリマーから切断させられる。試薬をしたのち、ペプチドは1%酢酸溶液でポリマーから

抽出され、これは次いで凍結乾燥を行って粗生産物を得る。これはふつう、5%

酢酸を溶媒として用い、セファデックスG-15のゲル濾過などの方法で精製される。カラムの適当な分画の凍結乾燥によって均一なペプチドまたはペプチドの誘導体を得られ、これは次いでアミノ酸分析、薄層クロマトグラフィー、高性能液体クロマトグラフィー、紫外吸収スペクトル分析、モル旋光度、溶解度等の標準の技術によって性質を決定し、固相エドマン分解によって定量を行った。

本発明は、NMPポリペプチドまたはその免疫原性のある断片と免疫反応性のある、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含む。必要な場合には、ポリクローナル抗体は、たとえばNMPポリペプチドが結合したマトリックスに結合させ、これから溶出することによってさらに精製することができる。本分野の専門家は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の精製および／または濃縮のための免疫学の技術における他のさまざまな一般的技術を承知しているであろう。基本的に異なるエピトープ特異性をもったモノクローナル抗体の集合より成る抗体および各単一のモノクローナル抗体が提供された。本発明で用いられる抗体または免疫グロブリンという用語は、無傷の分子およびNMPのエピトープ決定部位と結合する能力のあるFabおよびF(ab')<sub>2</sub>などの断片を含む。

NMPと結合する抗体の結合領域の同定と単離のための望ましい方法はバクテリオファージベクターシステムである。このベクターシステムは大腸菌におけるマウス抗体レパートリー (Huseら, Science, 246: 1275-1281, 1989)、およびヒト抗体レパートリー (Mullinaxら, Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 8095-8099,

1990) からのFab断片の組合わせライブラリーを発現させるために用いられてきた。そこで述べられているように、あらかじめ選択されたリガンドへの結合を示すレセプター (Fab分子) はこれらの抗体発現ライブラリーから同定され、単離された。この方法はモノクローナル抗体を発現しているハイブリドーマ細胞系列のあらかじめ選択されたリガンドとの結合に適用された。目標とするモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマは当業者にはよく理解されている技術を用い

て様々な方法で生産することができ、ここではあらためて繰り返さない。これらの技術の詳細はMonoclonal Antibodies-Hybridomas : A New Dimension in Biological Analysis, Edited by Roger H. Kennettら, Plenum Press, 1980 ; および米国特許第4,172,174号等（文献内容は参考としてここに組み入れる）に述べられている。

ここで用いられる用語“細胞増殖性疾患”は悪性および非悪性（良性）の異常を意味する。この用語はさらに過形成疾患をも含む。これらの増殖性疾患をもつ細胞は、しばしば周囲の正常細胞とはちがった形態学的および遺伝子型的な表現をもつ。さきに述べたように細胞増殖性疾患は、たとえば本発明のNMPの発現、または発現の不在と結びついている。細胞周期の不適切な時期における、または間違った細胞タイプにおけるNMPの発現は細胞増殖性疾患を招くかもしれない。アンチセンスポリヌクレオチドの形をとったNMPポリヌクレオチドはさまざまな器官系、とりわけたとえば、前立腺などの尿生殖器起源の過形成や悪性疾患の治療に有用である。さらに、腎臓や膀胱などの過形成や悪性疾患は本発明のNMPポリヌクレオチドを用いて治療することが可能

である。基本的に、NMPの発現と病因論的な結びつきをもついかなる疾患も、NMP発現を変調する本発明の薬剤によって治療を行うことが考慮されよう。“変調する”という用語は、NMPが不適切に発現しているときのNMP発現の抑制、または、過少に発現しているときのNMP発現の増強、または発現したNMPがこのポリペプチドの変異型である場合のNMPの発現の増強を期待したものである。細胞増殖性疾患がNMP発現と関係しているとき（たとえばBPC-1, 2, 3およびPC-1）、アンチセンスNMPポリヌクレオチド配列またはNMP結合抗体を細胞内に導入することができる。あるいは、細胞増殖性疾患が過少発現または変異NMPポリペプチド（たとえば、NPB1-7およびNP-1-3）の発現と関係がある場合には、センスNMPポリヌクレオチド配列（DNAコード配列）またはNMPポリペプチドを細胞内に導入することができる。

本発明は、NMPを発現しているかまたはNMP関連疾患をもつ細胞成分を該成分と結合する試薬と接触させることを含む、被検者におけるNMP発現細胞ま

たはNMP関連の細胞増殖性疾患を検出する方法を提供する。その細胞成分はDNAまたはRNAのような核酸、またはタンパク質でありうる。成分が核酸である場合には、試薬は核酸プローブまたはPCRプライマーである。細胞成分がタンパク質の場合には、試薬は抗体プローブである。プローブはたとえば放射性同位元素、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤、または酵素などによって直接的または間接的に標識されたものである。当業者は、プローブに結合させるための他の適当な標識を考えることができるであろう。

うし、また通常の実験によってそれを確かめることができるであろう。

本発明の目的のためには、NMPに対して特異的な抗体または核酸プローブは、生物学的液体または組織中のNMPポリペプチド（抗体を用いて）またはポリヌクレオチド（核酸プローブを用いて）の存在を検出するために用いることができる。NMP配列中のどのコード配列領域に基づくオリゴヌクレオチドプライマーも、たとえばPCRによるDNAの増幅に有用である。検出可能な量の抗原を含めば、どのような標品も使用可能である。本発明の望ましい標本、とくに前立腺癌の検出に望ましい標本は、尿生殖器由来、とくに前立腺の組織である。あるいは、精液または尿など、NMP関連細胞増殖性疾患の徴候を示す細胞を含むかもしれない生物学的液体を用いることができる。望ましい被検体はヒトである。

より高い感度を得られる他の技術は、プローブを低分子量のハプテンに結合させることから成るであろう。これらのハプテンは、二次反応の手段によって特異的に検出されうる。たとえば、アビジンと反応するビオチン、または特異的な抗ハプテン抗体と反応することができるジニトロフェノール、ピリドキサルおよびフルオレセインなどのハプテンを用いるのが一般的である。

さきに述べた本発明の特定のNMPを発現する細胞またはNMP関連の細胞増殖性疾患を検出するための方法は、臨床的に軽快した状態にある被検者における残存する前立腺癌または他の悪性疾患、または良性の過形成状態の検出のために用いることができる。さらに、細胞におけるNMPポリペプチドの検出方法は、  
特

定のNMPを発現している細胞を、正常細胞で発現しているNMPと比較して固定することを通じて、細胞増殖性疾患を検出するために有用である。本発明の方法を用いて、細胞におけるNMPの発現が同定され、適切な治療計画をたてることが可能である（たとえば、センスまたはアンチセンス遺伝子治療、および通常の化学療法）。本発明のNMPの発現パターンは細胞の悪性度の段階によって変化するので、前立腺組織などの標本は、NMPの発現を検出し、細胞の悪性度の段階を診断するために、一連のNMP特異的試薬（たとえば、核酸プローブまたはNMPに対する抗体）によってスクリーンできる。

本発明のモノクローナル抗体は、たとえば、液相でまたは固相担体に結合した状態で利用される、イムノアッセイへの使用に適している。さらに、これらのイムノアッセイにおけるモノクローナル抗体は、さまざまな方法で検出可能に標識しうる。本発明のモノクローナル抗体を用いることができるイムノアッセイのタイプの例は、直接または間接的フォーマットの拮抗的（競合的）または非拮抗的（競合的）イムノアッセイである。そのようなイムノアッセイの例にはラジオイムノアッセイ（RIA）およびサンドイッチ（イムノメトリック）アッセイがある。本発明のモノクローナル抗体を用いた抗原の検出は、生理学的な標本上の免疫組織化学アッセイを含め、前進（forward）、逆行（reverse）、同時のモードのいずれかで実施されるイムノアッセイを用いて行うことができる。あるいは、本発明の抗体は、ウェスタンブロットや二次元ゲルなどの電気泳動的に分散されるゲルプロトコールでNMPを検出するために用いることができる。本分野の専門家は不

必要な実験を経ずに、他のイムノアッセイ法があることがわかるし、また容易に確認できるだろう。

本発明のモノクローナル抗体は、さまざまな異なる担体に結合でき、NMPの存在を検出するのに用いられる。よく知られた担体の例は、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および改質セルロース、ポリアクリルアミド、アガロースおよびマグネタイトである。担体の性質は、本発明の目的に応じて可溶、不溶のどちらでもありうる

だろう。当業者はモノクローナル抗体を結合させるための他の適当な担体を考えることができるであろうし、その点は通常の実験を通して確かめることができるであろう。

アッセイを行うにあたって、インキュベーション液中に、ある種の“ブロッカー”を含ませることが望まれるかもしれない（通常、標識された可溶性抗体とともに加えられる）。“ブロッカー”は、実験標本中に存在する抗NMP免疫グロブリンに対する、非特異的なタンパク質、プロテアーゼまたは抗ヘテロ親和性免疫グロブリンなどが固相支持体の上の抗体または放射性標識した指示抗体を架橋または破壊することによって、誤った陽性または負の結果を生じることがないのを確実にするために加える。したがって“ブロッカー”の選択は本発明で述べられたアッセイの特異性に大きな影響を与える。

アッセイに用いられるものと同一のクラスまたはサブクラス（アイソタイプ）の無関係（すなわち非特異的）な抗体（たとえばIgG1, IgG2a, IgM等）が“ブロッカー”として用いられうる。適当な感度を保ちつつ、なお標本中に存在する交差反

応性のタンパク質による望ましくない干渉を防止するためには、“ブロッカー”の濃度（ふつう1-100 $\mu$ g/ $\mu$ l）が重要である。

本発明で用いられている用語“エピトープ”は、本発明のモノクローナル抗体と特異的な相互作用を行いうるあらゆる決定基を含む。エピトープ決定基は通常、アミノ酸または糖側鎖のような、分子の化学的に活性な表面グループより成り、通常、三次元構造的特徴および特定の荷電特徴をもっている。

本発明のモノクローナル抗体を、抗原のin vivo検出に使用するにあたっては、検出可能に標識されたモノクローナル抗体が、診断的に有効な量で与えられる。“診断的に有効な”とは、検出可能に標識された抗体が、モノクローナル抗体が特異的に結合するNMP抗原をもつ部位の検出を可能にするのに十分な量で投与されることである。

投与される、検出可能に標識されたモノクローナル抗体の濃度は、NMPをもつ細胞への結合がバックグラウンドに対して検出可能であるような十分量でなけ

ればならない。さらに、最良の標的対バックグラウンドのシグナル比を得るためには、検出可能に標識された抗体は循環系から速やかに除去されることが望ましい。

原則的には、in vivo診断のための、検出可能に標識されたモノクローナル抗体の投与量は、被検者の年齢、性別、疾患の程度により変わるであろう。モノクローナル抗体の投与量は約 $0.001\text{mg}/\text{m}^2$  から約 $500\text{mg}/\text{m}^2$  の範囲であり、望ましいのは $0.1\text{mg}/\text{m}^2$  から約 $200\text{mg}/\text{m}^2$ 、最も望ましいのは約 $0.1\text{mg}/\text{m}^2$  から約 $10\text{mg}/\text{m}^2$  である。そのような投与量は、たとえば注射を複数回行うか、腫瘍の重症度および当業者に知られている他の要因によって変化し

うる。

in vivo診断造影を得るためには、与えられた放射性同位元素の選択にあたって、使用できる検出機器のタイプが主な要因となる。選ばれる放射性同位元素は、与えられた機器のタイプによって検出可能な崩壊のタイプをもたなければならない。in vivo診断のための放射性同位元素を選ぶための他の重要な要素は、放射性同位元素の半減期が、標的によって最大にとり込まれた時点でもなお検出できるに十分なだけ長く、宿主への有害な照射が最小となるのに十分なだけ短いようにすることである。理想的には、in vivo造影に用いられる放射性同位元素は粒子の放出がなく、しかし通常のガンマカメラで容易に検出されるような、 $140 \sim 250\text{keV}$ の領域で大量の光子を生じるものである。

in vivo診断のためには、放射性同位元素は中間的官能基を用いて直接または間接に免疫グロブリンに結合させることができる。免疫グロブリンに金属イオンとして存在する、放射性同位元素を結合するために用いられることの多い中間的官能基はジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA) およびエチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) および類似の分子などの二官能性キレート剤である。本発明のモノクローナル抗体に結合することのできる典型的な金属イオンとしては、 $^{111}\text{In}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{89}\text{Zr}$  および  $^{201}\text{Tl}$  がある。

本発明のモノクローナル抗体は、磁気共鳴造影 (MRI) または電子スピン共鳴 (ESR) におけるように、in vivo診断の目的のために常磁性同位体で標識

することができる。一般的に診断的造影を視覚化するための通常の方法は何であっても用いること

ができる。ふつう、ガンマ線およびポジトロン放出放射性同位元素がカメラ造影用に、常磁性同位元素がMRIのために使われる。それらの技術にとくに有用な元素には<sup>157</sup>Gd, <sup>55</sup>Mn, <sup>162</sup>Dy, <sup>52</sup>Crおよび<sup>56</sup>Feが含まれる。

本発明のモノクローナル抗体は、NMP関連細胞増殖性疾患の回復の過程をモニターすることに用いられうる。したがって、NMPを発現する細胞数の増減または精液や尿などのさまざまな体液中に存在するNMPの変動を測定することによって、疾患の改善を狙った特定の治療法が有効であるかどうかを決定することが可能であろう。

本発明のモノクローナル抗体はまた単独で、あるいはエフェクター細胞との組合せで (Douillardら, Hybridoma, 5 Supp. 1: S 139, 1986)、本発明のモノクローナル抗体B反応性のあるエピトープをもったNMPポリペプチドを発現する細胞増殖性疾患を有する動物における免疫療法に用いることができる。

免疫療法に用いる場合、本発明のモノクローナル抗体は治療薬で標識されることもされないこともあろう。これらの薬剤は本発明のモノクローナル抗体に直接または間接的に結合させることができる。間接的な結合の一つの例はスペーサー成分 (moiety) を用いることである。これらのスペーサー成分 (moiety) は不溶性または可溶性 (Dienerら, Science, 231: 148, 1986) のどちらでもよく、また標的部位でモノクローナル抗体分子からの薬剤の放出を可能にするよう選択されうる。免疫療法のための本発明のモノクローナル抗体に結合させることのできる治療薬の例は、薬物、放射性同位元素、レクチン、毒素などである。

本発明のモノクローナル抗体に結合させうる薬物はタンパク質性および非タンパク質性の薬物を含む。“非タンパク質性薬物”という用語はたとえばマイトマイシンC、ダウノルビシンおよびビンブラスチンなどの古典的に薬物と呼ばれている化合物を含む。

本発明のモノクローナル抗体の標識に用いることのできるタンパク質性の薬物



は、免疫調節因子 (immunomodulator) およびその他の生体応答改変剤 (modifier) を含む。“生体応答改変剤”という用語は、本発明のモノクローナル抗体が特異性を示すNMP関連腫瘍の破壊を促進するように免疫応答を改変することに関与する物質を含む。免疫応答改変剤の例は、リンホカインのような化合物を含む。リンホカインは腫瘍壊死因子、インターロイキン、リンホトキシン、マクロファージ活性化因子、遊走阻止因子、コロニー刺激因子、およびインターフェロンなどを含む。本発明のモノクローナル抗体を標識することのできるインターフェロンは、 $\alpha$ インターフェロン、 $\beta$ インターフェロンおよび $\gamma$ インターフェロンおよびこれらのサブタイプを含む。

免疫療法のための、本発明の放射性同位元素を結合したモノクローナル抗体の使用にあたっては、腫瘍細胞の分布および同位元素の安定性と放射などの要因によって、ある種のアイソタイプが他のアイソタイプよりも望ましいということがある。必要があれば、腫瘍細胞の分布は上に述べたin vivoの診断技術によって評価されうる。細胞増殖性疾患によっては、ある放射性物質がほかの放射性物質より好まれることがある。一般的に、アルファおよびベータ粒子を放出する放射性同位元素が免疫療法には好まれる。たとえば、動物が固形の腫瘍病巣をもつ場合には、 $^{90}\text{Y}$ など、

数ミリメートルの組織を貫通できる高エネルギーのベータ放射性物質が望ましい。これに反して、細胞増殖性疾患が白血病の場合のような単純な標的細胞から成る場合も、 $^{212}\text{Bi}$ などの短距離の高エネルギーアルファ放射性物質が望ましい。治療を目的として本発明のモノクローナル抗体に結合させることのできる放射性同位元素の例は、 $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{65}\text{Zn}$ および $^{188}\text{Re}$ である。

レクチンは通常植物材料から単離され、特定の糖成分に結合するタンパク質である。多くのレクチンはまた細胞を凝集させ白血球を刺激する能力をもつ。しかし、リシンは免疫療法に用いられてきた毒性のレクチンである。これは毒性の起源であるリシンの $\alpha$ ペプチド鎖を抗体分子に結合し、毒性効果の部位特異的デリバリーを可能にすることを通じて達成される。

毒素は十分量では致死的な効果をもつことが多い、植物、動物、または微生物によって生産される有毒の物質である。ジフテリア毒素はCorynebacterium diphtheriaによって生産される物質であり、治療目的に使うことができる。この毒素は適当な条件下では分離できる $\alpha$ および $\beta$ サブユニットからできている。毒素A成分は抗体に結合させることができ、NMP保有細胞への部位特異的デリバリーに用いられる。本発明のモノクローナル抗体と結合させうる他の因子は、当業者には知られているかまたは容易に確かめられるであろう。

本発明の標識または未標識モノクローナル抗体は、上記のような治療剤と組み合わせて使用することもできる。特に好ましいのは、本発明のモノクローナル抗体、免疫調節剤、および他の生物学的応答変更剤(modifier)からなる治療剤の組み合わせである。

このように、本発明のモノクローナル抗体は例えばアルファインターフェロンと組み合わせて使用することができる。この治療様式は、癌細胞によるモノクローナル抗体反応性抗原の発現を増大させることにより、モノクローナル抗体の癌に対する標的設定を強化する(Greinerら、Science, 235:895, 1987)。あるいは、本発明のモノクローナル抗体は例えばガンマインターフェロンと組み合わせて使用できる。この場合エフェクター細胞によるFc受容体の発現が活性化および増大され、その結果モノクローナル抗体のエフェクター細胞との結合を増進し、標的腫瘍細胞を殺す。当業者は種々の生物学的応答変更剤を選択し、本発明のモノクローナル抗体の効力を強化する所望のエフェクター機能を創造できる。

本発明のモノクローナル抗体をここに記述するような種々の治療剤と組み合わせて用いる場合には、モノクローナル抗体および治療剤は通常実質的に同時期に投与される。「実質的に同時期に」という表現は、モノクローナル抗体および治療剤が時間的にかなり接近して投与されることを意味する。通常、治療剤をモノクローナル抗体より先に投与することが好ましい。例えば、治療剤をモノクローナル抗体の1～6日前に投与することができる。治療剤の投与は、例えば腫瘍の性質、患者の状態、および治療剤の半減期等の因子により、毎日行なうことも可

能であるし、または

他の任意の間隔で行なうこともできる。

本発明のモノクローナル抗体を使用して、本明細書に記述されているすべての特徴を結合した治療法を設計することができる。例えば、ある与えられた状況においては、本発明のモノクローナル抗体をエフェクター細胞および同じまたは異なる治療剤と組み合わせて投与する前に、1つまたは複数の治療剤を投与することが望ましいであろう。例えば、前立腺、腎臓または膀胱癌の患者にまずガンマーインターフェロンおよびインターロイキン-2を3～5日間毎日投与し、5日目に本発明のモノクローナル抗体をエフェクター細胞ならびにガンマーインターフェロンおよびインターロイキン-2と組み合わせて投与することが望ましいであろう。

また、本発明のモノクローナル抗体と共にリポソーム類を抗体の膜として使用し、NMPを発現している腫瘍にリポソームを特異的に送達させることも可能である。これらのリポソーム類は、モノクローナル抗体のほかに腫瘍部位に到達して放出される前記のような免疫治療剤を含有するように作成することができる (Wolffら、Biophysical Acta, 802:259, 1984)。

本発明のモノクローナル抗体の投与量範囲は、悪性疾患の症状を改善する所望の効果を奏するに十分なだけ大きい投与量範囲である。投与量は、望ましくない交差反応、アナフィラキシー反応等の副作用を生じるほど大きくてはならない。一般的に、投与量は患者の年齢、状態、性別、病気の程度によって変わり、当業者によって決定されうる。投与量は合併症の場合、各医師によって調整可能である。投与量は約0.1mg/kgから約2000mg/kgの

間であり、好ましくは約0.1mg/kgから約500mg/kgであり、1日または数日間、1日に1回または複数回投与される。一般に本発明のモノクローナル抗体を治療剤と組み合わせて投与する場合は、in vivo診断イメージングに使用される用量に匹敵するより低い用量が使用できる。

本発明のモノクローナル抗体は、注射または時間をかけた緩慢な灌流により非

経口的に投与することができる。本発明のモノクローナル抗体は、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、体腔内に、または経皮的に、単独でまたはエフェクター細胞と組み合わせて投与することができる。

本発明はまた、NMP関連細胞増殖性疾患の患者をNMPヌクレオチド配列を用いて治療する方法を提供する。サブレッサーポリペプチドをコードする可能性のあるNMPヌクレオチド配列は、正常細胞における発現に較べて少なく発現される可能性がある。それゆえ、この配列に向けられた適切な治療または診断技法を設計することが可能である。したがって、細胞増殖性疾患が悪性疾患に関連したNMPの発現を伴う場合は、翻訳レベルでNMP発現を妨害する核酸配列が使用できる。この方法は、例えばアンチセンス核酸およびリボザイムを利用して、特定のNMP mRNAをアンチセンス核酸でマスクするか、またはそれをリボザイムで開裂することにより、特定NMP mRNAの翻訳を阻止する。細胞増殖性疾患または異常細胞表現型が例えばNMPサブレッサーの過少発現を伴う場合は、障害を有する患者にNMPをコードする核酸配列（センス）を投与することができるであろう。

アンチセンス核酸とは、特定のmRNA分子の少なくとも一部

に対して相補的なDNAまたはRNA分子である（Weintraub, Scientific American, 262: 40, 1990）。細胞内でアンチセンス核酸は対応するmRNAとハイブリダイズし、2本鎖分子を形成する。細胞は2本鎖をなすmRNAを翻訳しないので、アンチセンス核酸はmRNAの翻訳を妨害する。約15個のヌクレオチドからなるアンチセンスオリゴマーが好ましい。なぜなら、それらは容易に合成され、また標的のNMP産生細胞に導入した時に大きい細胞よりも問題を起こすことが少ないからである。遺伝子のin vitro翻訳を阻止するためにアンチセンス法を用いることは当分野では周知である（Marcus-Sakura, Anal. Biochem., 172: 289, 1988）。

リボザイムとは自分以外の1本鎖RNAをDNA制限エンドヌクレアーゼと類似の方法で特異的に開裂する能力を有するRNA分子である。これらのRNAをコードするヌクレオチド配列の修飾によって、RNA分子中の特異的ヌクレオチ

ド配列を認識し、そのRNA分子を開裂する分子を工学的に作成することが可能である (Cech, J. Amer. Med. Assn., 260 : 3030, 1988)。この方法の主要な利点は、それらの分子が配列特異的であるため、特定の配列を有するmRNAのみが不活性化されることである。

リボザイムには2つの基本的な型がある。すなわち、テトラヒメナ (tetrahyn eba) 型 (Hasselhoff, Nature, 334 : 585, 1988) および「ハンマーヘッド」型である。テトラヒメナ型リボザイムは長さが4塩基の配列を認識し、ハンマーヘッド型リボザイムは長さが11~18塩基の塩基配列を認識する。認識配列が長いほど、その配列が標的mRNA種においてのみ起こる可能性が大きい

。したがって、特異的mRNA種を不活性化するためにはテトラヒメナ型リボザイムよりハンマーヘッド型リボザイムが好ましく、18塩基からなる認識配列はより短い認識配列より好ましい。

本発明はまた、NMPによって仲介される細胞増殖性疾患を治療するための遺伝子治療法を提供する。このような治療は、適切なNMPポリヌクレオチド (アンチセンスまたはセンス) を増殖性疾患を有する患者の細胞に導入することによってその治療的効果を達成するであろう。アンチセンスNMPポリヌクレオチドの送達は、キメラウイルス等の組換え発現ベクターまたはコロイド分散系を用いることにより達成できる。NMPの過少発現または癌を伴うNMPの発現を伴う疾患は、それぞれセンスまたはアンチセンス核酸配列を用いる遺伝子治療法によって治療することができるであろう。

本明細書に教示する遺伝子治療に使用できる種々のウイルスベクターには、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスまたは、好ましくはレトロウイルスのようなRNAウイルスが含まれる。好ましくは、そのレトロウイルスベクターは、マウスまたはトリのレトロウイルスの誘導體である。単一の外来遺伝子を挿入することのできるレトロウイルスベクターの例として以下のものが挙げられるが、それらだけに限定されない。すなわち、モロニーマウス白血病ウイルス (MoMuLV)、ハーベイマウス肉腫ウイルス (HaMuSV)、マウス乳腺癌ウイルス (MuMTV) およびラウス肉腫ウイルス (RSV) である。多くの追加のレトロウ

ウイルスベクターは、多重遺伝子を導入できる。これらのベクターはすべて、選択マーカー用の遺伝子を移動又は導入できるので、導入細胞が

同定され、生成される。興味のあるNMP配列を、例えば特定の標的細胞上の受容体に対するリガンドをコードする別な遺伝子と共にウイルスベクターに挿入することにより、そのベクターは標的的特異的となる。例えば糖、糖脂質、またはタンパク質をコードするポリヌクレオチドを挿入することによって、レトロウイルスベクターを標的的特異的とすることができる。好ましい標的設定は、レトロウイルスベクターを標的とする抗体を用いることにより達成される。当業者は、レトロウイルスゲノム中に挿入されNMPセンスまたはアンチセンスポリヌクレオチドを含有するレトロウイルスベクターの標的的特異的送達を可能とする特異的ポリヌクレオチド配列を知り、また過度の実験を行なうことなく容易に確かめることができるであろう。

組換えレトロウイルスは不完全なものなので、感染性のベクター粒子を産生するためには助けを必要とする。この助けは、例えばLTR内の調節配列の制御下にあるレトロウイルスの構造遺伝子の全てをコードするプラスミドを含有するヘルパー細胞系を使用することにより得られる。これらのプラスミドは、パッケージング機構が包み込み(encapsidation)のためのRNA転写物の認識を可能とするヌクレオチド配列を欠く。パッケージングシグナルを欠失したヘルパー細胞系には、例えばΨ2、PA317およびPA12が含まれるが、これらだけに限定されない。これらの細胞系は、ゲノムが全くパッケージされないので中空ウイルス粒子を産生する。パッケージングシグナルは無傷だが構造遺伝子が他の興味のある遺伝子に置き換えられている細胞にレトロウイルスベクターが導入されると、ベクターはパッケージされ、ベクタ

ーウイルス粒子が産生される。

または、通常のリン酸カルシウムトランスフェクションにより、NIH 3T3もしくは他の組織培養細胞に、レトロウイルス構造遺伝子gag, polおよびenvをコードするプラスミドを直接トランスフェクトさせることも可能である。次に

、これらの細胞に興味のある遺伝子を含有するベクタープラスミドをトランスフェクトさせる。得られた細胞はレトロウイルスベクターを培地に放出する。

NMPアンチセンスポリヌクレオチドのためのもう1つの標的設定された送達系はコロイド拡散系である。コロイド拡散系には、巨大分子複合体、微小カプセル、微小球体、ビーズ、および水中油滴エマルジョン、混合ミセルおよびリポソームを含む脂質に基づく系が含まれる。本発明における好ましいコロイド系はリポソームである。リポソームはin vitroおよびin vivoの送達手段として有用な人工膜小胞である。1枚の薄層からなるサイズが0.2~4.0  $\mu\text{m}$ の大きい小胞(LUV)は、大きい巨大分子を含有する水性緩衝液の相当な部分を包み込むことが可能であることが判明している。RNA、DNAおよび無傷のウイルス粒子を水性の内部に包み込み、生物学的に活性な形態で細胞に送ることが可能である(Fraleyら、Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981)。哺乳動物細胞に加え、リポソームは植物、酵母、および細菌細胞におけるポリヌクレオチドの送達に使用されてきた。リポソームが有効な遺伝子輸送手段であるためには、以下の特徴が存在しなければならない。すなわち、(1)高い効率での、また生物学的活性を損なうことのない、興味のある遺伝子の包み込み；(

2) 非標的細胞と比較して、標的細胞と優先的かつ実質的な結合；(3)小胞の水性内容物の標的細胞細胞質への高効率での送達；および(4)遺伝子情報の正確かつ効果的な発現(Manninoら、Biotechniques, 6:682, 1988)。

リポソームの組成は普通リン脂質、特に高相転移温度リン脂質と通常はステロイド、特にコレステロールとの組み合わせである。他のリン脂質または他の脂質もまた使用できる。リポソームの物理的特徴は、pH、イオン強度、および二価のカチオンの存在に依存する。

リポソーム作成に有用な脂質の例には、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン等のホスファチジル化合物、スフィンゴ脂質、セレブロシド、およびガングリオシドが含まれる。特に有用なのは脂質部分が14~18個、特に16~18個の炭素原子を含有し、飽和しているジアシルホスファチジルグリセロールである。例示

的なリン脂質には、卵ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、およびジステアロイルホスファチジルコリンが含まれる。

リポソームの標的設定は解剖学および機械学的因子に基づいて分類されている。解剖学的分類は、例えば臓器特異的、細胞特異的、および細胞小器官特異的等の選択性のレベルに基づくものである。機械学的標的設定は、それが受動的か能動的かに基づいて区別できる。受動的標的設定は洞様毛細血管を含有する臓器における網内細胞系（RES）の細胞に分布するリポソーム生来の傾向を利用する。他方、能動的標的設定は、自然に存在するリポ

ソームの局在部位とは異なる臓器および細胞型への目標付けを達成するため、リポソームをモノクローナル抗体、糖、糖脂質、またはタンパク質等の特異的リガンドと結合させることによる、またはリポソームの組成もしくは大きさを変えることによるリポソームの変更を含む。

標的設定された送達系の表面を種々の方法で修飾することが可能である。リポソームからなる標的設定された送達系の場合は、標的設定リガンドをリポソームの二重膜と安定した結合状態で維持するため、脂質基をリポソームの脂質二重膜に組み込むことができる。脂質鎖を標的設定リガンドと結合するために、種々の結合基が使用できる。

一般的に、標的設定された送達系の表面に結合される化合物は、標的設定された送達系が所望の細胞を発見し、そこに向かって進むことを可能とするようなリガンドおよび受容体であろう。リガンドは別の化合物（例えば受容体）と結合する、興味のある任意の化合物であってよい。

一般的に、特異的エフェクター分子と結合する表面膜タンパク質は受容体と称される。本発明においては、本発明の抗体は好ましい受容体である。リポソームを特異的細胞表面リガンド（この場合、選択されたNMP）に向かわせるために、抗体を使用することができる。好ましくは標的組織は尿生殖器で、特に前立腺組織である。腎臓および膀胱組織もまた使用できる。ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体をリポソーム二重膜に共有結合させるためには多数の方法が使用できる。抗体によって標的設定されたリポソームは、モノクローナルもしくは



はポリクローナル抗

体、または標的細胞上の抗原性エピトープに効率よく結合しさえすればそれらの断片、例えばF a bまたはF ( a b' )<sub>2</sub>等を含むことができる。

非経口投与のための調製物には、滅菌水性または非水性溶液、懸濁液およびエマルジョンが含まれる。非水性溶媒の例としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブオイル等の植物油、およびオレイン酸エチル等の注射可能な有機エステルが挙げられる。水性担体には、水、アルコール性／水性溶液、エマルジョンまたは懸濁液が含まれ、さらに生理食塩水及び緩衝化媒体が含まれる。非経口的ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンガーブドウ糖、ブドウ糖および塩化ナトリウムが含まれる。乳酸加リンガー静注ビヒクルは、流体および養分補充物、電解質補充物（例えばリンガーブドウ糖に基づくもの）等を含む。防腐剤及び他の添加物、例えば抗菌剤、酸化防止剤、キレート化剤、不活性ガス、等も存在してよい。

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドまたはモノクローナル抗体を含有する薬剤または医薬組成物の調製方法に関し、該薬剤はNMP関連細胞増殖性疾患の治療に使用されるものである。

本発明のNMPは、細胞のNMPに影響を及ぼす組成物をスクリーニングする道具として有用である。したがって本発明は別の態様において、試験すべき組成物および細胞（または細胞懸濁液）を含む成分をそれらの成分の相互作用を可能とするのに十分な条件下でインキュベートし、次に該組成物のNMPへの効果を測定することを含む、NMPに影響を及ぼす組成物を同定する方法を提供する。NMPに対する観察される効果は、阻害的または刺

激的でありうる。

例えば、前立腺の悪性疾患細胞において、BPC-1、BPC-2、PBC-3またはPC-1発現に対して阻害的な組成物は、その組成物で処理する前と後に、細胞または細胞抽出物におけるNMPレベルを測定することにより同定することができる。または、NP-1、NP-2またはNP-3のレベルをモニター

して、正常細胞に見いだされるこれらNMPの発現を刺激する組成物を同定することも可能である。

本発明のアッセイに使用される材料は、キットの作成に理想的に適合している。このようなキットは、バイアル、試験管、等の1個以上の容器手段を厳重収納するために小区画に分けられたキャリアー手段を包含することができ、各容器手段は上記の方法で使用される個々のエレメントのうち1つを包含する。

例えば、容器手段の1つは検出可能に標識された、または標識可能なプローブを包含することができる。このようなプローブは、標的タンパク質または標的核酸に対してそれぞれ特異的な抗体またはヌクレオチドでありうる。ここでその標的は本発明のNMPの存在を示すか、またはその存在と相互関係を有する。標的核酸を検出するのにキットが核酸ハイブリダイゼーションを使用する場合は、キットは標的核酸配列を増幅するためのヌクレオチドを含有する容器、および／または例えばビオチン結合タンパク質、例えばレポーター分子に結合したアビジンまたはストレプトアビジン、酵素、蛍光または放射核種標識、等のレポーター手段を包含する容器をも持つことができる。

以下に記述する実施例は本発明を説明するためのものであり、

本発明を制限するものではない。このような実施例は、使用されるであろう方法の典型的なものであるが、当業者に公知の他の方法を代わりに使用することもできる。

#### 実施例1

##### 核マトリックスタンパク質の同定および精製

患者。臨床的に限局性の（B段階、T2）前立腺癌（N=19）〔グリーンソン（Gleason）等級5～9〕のため恥骨後方前立腺完全切除を受ける、または良性前立腺過形成（BPH, N=2）のため開放（open）前立腺切除を受ける21名の男性患者由来の新鮮な前立腺組織を検査した。

組織調製物。外科的摘出から15分以内に新鮮な組織を得た。14個の標本由来の顕著な腫瘍小結節1個から約1グラムの総腫瘍を取った。1グラムの正常な前立腺組織を、13個の標本における腫瘍小結節に対側性の前立腺葉から得た。

1グラムのBPH組織を、12個の標本における対側性葉の尿道周囲領域より得、2個の開放(open)前立腺切除標本のそれぞれから25~30グラムのBPH組織を得た。除去されたすべての組織は、ヘマトキシリンおよびエオシン切片を用いて、切片の近位および遠位両末端について組織学的に確認した。

核マトリックスタンパク質の精製。FeyおよびPenmanの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:121-125, 1988)にしたがって、核マトリックスタンパク質を単離した。要約すると、新鮮なヒト前立腺組織を小片(1mm<sup>3</sup>)に刻み、テフロン製乳棒を用いて氷

上で2mMバナジリリボヌクレオシド(RNAase阻害剤)および1mMフッ化フェニルメチルスルホニル(セリンプロテアーゼ阻害剤)を含有する溶液に溶解した0.5%Triton X-100とホモジナイズし、脂質および可溶性タンパク質を放出させた。次に、抽出物を350ミクロンのナイロンメッシュで濾過し、0.25M硫酸アンモニウムを用いて抽出し、可溶性の細胞骨格エレメントを放出させた。可溶性クロマチンを除去するため、25℃でDNases処理を行なった。残存画分は中間フィラメントおよび核マトリックスタンパク質を含有していた。次にこの画分を8M尿素を用いて分解し、不溶性成分(主として炭水化物および細胞外マトリックス成分からなる)をペレット化した。上記の尿素を透析により除去し、中間フィラメントを再度集合させ、遠心により除去した。次に核マトリックスタンパク質をエタノール沈降させた。Comassie<sup>TM</sup> Plusタンパク質アッセイ試薬キット(Pierce, Rockford, IL)を用いて、タンパク質濃度を測定した。ゲル電気泳動の準備のため、核マトリックスタンパク質を9M尿素、65mM 3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアミノ]-1-プロパノスルホネート、2.2%両性電解質、および140mMジチオトレイトルからなるサンプル緩衝液に再度溶解した。

二次元電気泳動。Investigator 2-Dゲルシステム(Milligan/Biosearch, Bedford, MA)を用いて高分解能二次元ゲル電気泳動を実施した(Patton, W.F.ら、BioTechniques, 8:518-527, 1990)。1.5時間の前電気泳動(prefocusing)の後で、1mm x 18cmのチューブゲル(tube gel)を用いて、18,000 V-hで一次元等電点電気泳動を実施した。チューブゲルを押し出し、1-mmのあらか

じめ流しておいた10%Tris-酢酸ドデシル硫酸ナトリウムDuracryl™ (Millipore, Co., Bedford, MA) 高引張り強度 (HTS) ポリアクリルアミド電気泳動スラブゲルの上に載せ、12°Cの一定温度に制御してゲルを約5時間電気泳動にかけた。50%メタノールおよび10%酢酸でゲルを固定した。十分に洗浄して再度脱水したのち、50mMリン酸 (pH 7.2) で緩衝化してからゲルを5%グルタルアルデヒドおよび5mMジチオトレイトルで処理した。Wrayの方法 (Wray, W. ら、Anal. Biochem, 118:197-203, 1981) を用いて、ゲルを銀染色した (Accurate Chemical Co., Inc., Westbury, NY)。50マイクログラムの核マトリックスタンパク質を各ゲルに負荷した。タンパク質分子量標準は、GELCODE (Dacheng, H. ら、J. Cell Biol., 110:569-580, 1990)、タンパク質分子量マーケットキット (MW 12,400~97,400) (Pierce, Rockford, IL) を用いて測定した。等電点は、カルバミル化クレアチンキナーゼ標準品 [pH7.0~4.950, (BDH Limited, England)] を用いて測定した。核マトリックスタンパク質の組織間における変異を決定する際は、種々の組織由来のすべてのサンプルにおいて明確に、かつ再現性をもって観察された、または存在しなかったタンパク質スポットのみを考慮した。

患者間の核マトリックスタンパク質パターンには、150個のタンパク質スポットのうちどの患者にも一貫して見られる約120個について、顕著な類似性が見られた。正常、前立腺BPH、および前立腺癌を比較したときに一貫して存在する、または不在の14個の核マトリックスタンパク質が同定された。分子量が56KdでpI=6.58のタンパク質 (PC-1) は、検査した

すべて (14/14) のヒト前立腺癌標本に現れたが、正常な前立腺組織 (0/13) またはBPH組織 (0/14) においては全く検出されなかった核マトリックスタンパク質を表した。

図1は正常なヒト前立腺 (A)、良性前立腺過形成 (B) および前立腺癌 (C) の核マトリックスタンパク質組成を示す。ほとんどの核マトリックス調製物に存在することが知られている4つのタンパク質、すなわちラミンA、ラミンB、ラミンCおよびアクチンが以前に報告された分子量および等電点に基づいて同定され (Fey, E.G. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:121-125, 1988)、図1

AにそれぞれLA、LB、LCおよびAと明示された。

図1は、正常なヒト前立腺(図1A)、ヒトBPH(図1B)およびヒト前立腺癌(図1C)より単離された核マトリックスタンパク質の典型的な高分解能二次元ゲル電気泳動パターンを示す。正常な前立腺、BPHおよび前立腺癌(全標本を検査)の間で異なるゲルスポットを矢印でマークし、表1で用いられている名称と対応するレッテルを付けて同定した。表1は、21名の患者からなる群の正常な前立腺、BPHおよび前立腺癌組織由来の核マトリックスタンパク質を比較したとき、一貫して存在する、または不在であることが判明した14個の異なるタンパク質スポットの分子量および等電点を示す。

図2は、種々の組織間で異なったタンパク質スポットの位置を要約し、またBPHおよび前立腺癌における特異的核マトリックスタンパク質を示す。正常な前立腺、BPHおよび前立腺癌の主要な組織特異的核マトリックスタンパク質の概要である。略語：

kD—単位1000で表された分子量、SDS-PAGE—ドデシル硫酸ナトリウム—ポリアクリルアミドゲル電気泳動、pI—等電点、およびBPH—良性前立腺過形成。

BPHにのみ存在し、正常な前立腺および前立腺癌には存在しないというNMPは検出されなかった。同様に、正常な前立腺および前立腺癌の両方に存在するが、BPHには存在しないというNMPはなかった。PC-1(分子量が56Kdで等電点が6.58)は、ヒト前立腺癌組織にのみ見られ、正常な前立腺およびBPHサンプルのすべてに一貫して存在しなかったNMPを表す。追加の試験において、PC-1は腎臓および膀胱癌の標本に発見されたが、正常な腎臓および膀胱組織には検出されなかった。

悪性疾患細胞におけるNB P-1-7およびNP-1-3の不在は、これらのNMPをコードする遺伝子は癌サプレッサー遺伝子として機能するのかもしれないことを示唆している。このことは、良性過形成組織においても不在であったNP-1-3について特にそう言える。

表 1

新鮮な正常前立腺、B P Hおよび前立腺癌組織由来の  
核マトリックスタンパク質

タンパク質	分子量	p I	正常 (N=13)	B P H (N=14)	癌 (N=14)
NPB-1	17,000	6.91	+	+	-
NPB-2	17,000	8.30	+	+	-
NPB-3	12,000	8.40	+	+	-
NPB-4	12,000	6.91	+	+	-
NPB-5	43,000	6.27	+	+	-
NPB-6	43,000	6.22	+	+	-
NPB-7	43,000	6.14	+	+	-
NP-1	12,000	7.50	+	-	-
NP-2	11,500	7.62	+	-	-
NP-3	11,000	8.30	+	-	-
BPC-1	42,500	5.80	-	+	+
BPC-2	42,000	5.73	-	+	+
BPC-3	41,000	5.64	-	+	+
PC-1	56,000	6.58	-	-	+

N P - 正常な前立腺

B - B P H

P C - 前立腺癌

各タンパク質の名称は、図1において同定されたタンパク質に対応している。

#### 実施例 2

##### 正常な前立腺細胞から前立腺癌への進行モデル

前立腺疾患発症に必要な正確な分子のおよび／または環境的現象はほとんど分かっていないが、前立腺癌の発症は多段階過程であることが充分立証されている (Carter, H.B. ら、J. Urol., 143: 742-746, 1990)。Ashley (Ashley, D.F.B., J. Path. Bact., 90: 217-225, 1965) ならびにArmitageおよびDoll (Armitage, P. およびDoll, R., Brit. J. Cancer, 8: 1-15, 1954) の独創的研究に基づく、米国における前立腺癌およびB P Hに関する年齢特異的発症率を用いた疫学

的研究は、BPHの発症は2段階過程である可能性が高く、他方、臨床的に明確な前立腺癌の発症は多段階（2現象より多い）過程を包含する可能性が高いことを示している（Carter, H.B.ら、J. Urol., 143:742-746, 1990）。

正常な前立腺上皮細胞のBPHまたは前立腺癌への進行に関して、2つの異なるモデルを仮定することができる。図3は、正常な前立腺（Normal）から良性前立腺過形成（BPH）への、または前立腺癌（Cancer）への多段階的進行の2つのモデルを示す。モデルIは類似の現象が両方の経路で起こることを予測する。モデルIIは、正常からBPHへ進行する際は、癌へと進行する際とは異なる現象が起こることを予測する。最初のモデル（モデルI）は、正常からBPHへ、または正常から前立腺癌へ進行する際の初期の現象は類似している（モデルIの現象A-B）と予測する。第2のモデル（モデルII）は、BPHおよび癌への進行は異なる現象を経るものであろうと予測する（現象A-B対現象E-H）。核マトリックスタンパク質の存在または不在をこれらのモデルをテストする表現型マーカーとして用いると、特定グループのタ

ンパク質スポットがBPHおよび前立腺癌の両方に不在または存在し（NP 1-3, BPC 1-3）、さらに付加的タンパク質スポットが前立腺癌にのみ存在または不在であれば（NPB1-7またはPC-1）、モデルIは満たされるであろうと予測される。このように、核マトリックスタンパク質において観察されたすべての相違はモデルIを満足させた。モデルIIを満足させるには、1つまたは複数のタンパク質がBPHにのみ存在または不在である必要があり、これはいかなるサンプルにおいても観察されなかった。したがって、これらのデータはBPHへと進行する細胞の核マトリックス内では前立腺癌へと進行する細胞に起こるのと類似の表現型発現が起こる、とするモデルIを支持する。その結果、本発明のNMPは前立腺癌のような細胞増殖疾病の正常から良性疾患、良性疾患から悪性疾患への段階と進行をモニターし、検出するのに使用できる。次に、この情報を適切な治療を開始するために使用できる。

上記は本発明を説明するためのもので、本発明の範囲を制限するものではない。実際、当業者はここに記述された教示に基づいて、過度の実験を行なうことな

く、容易に更なる態様を想像し、作り出すことができよう。

【図1】

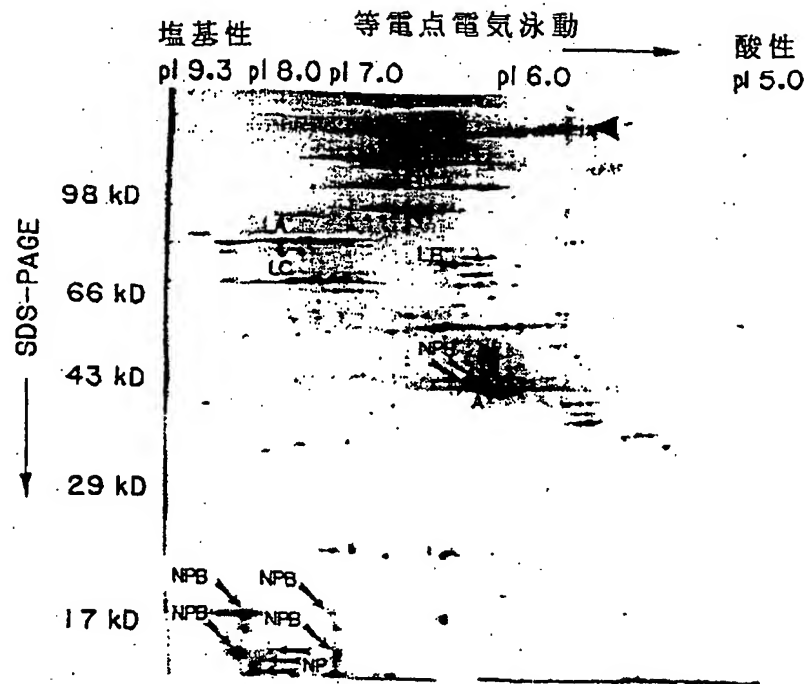


FIG. 1A

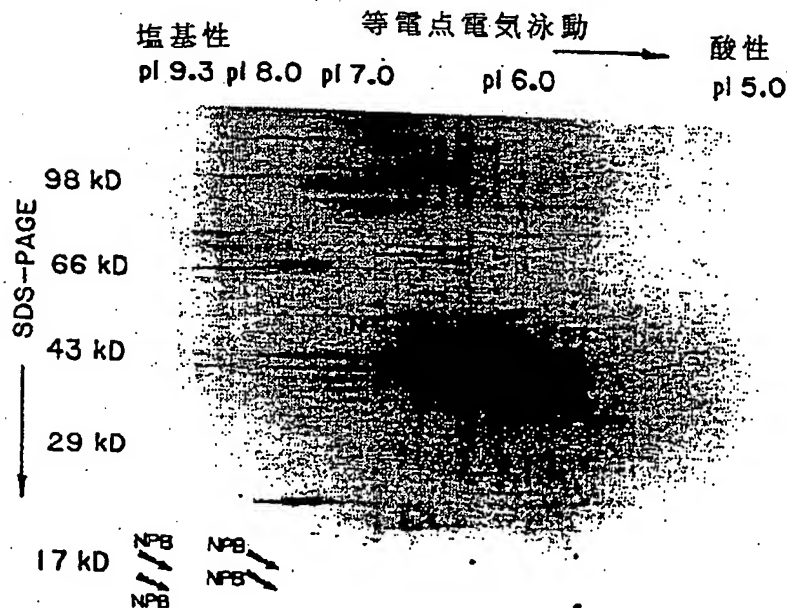


FIG. 1B



【図1】

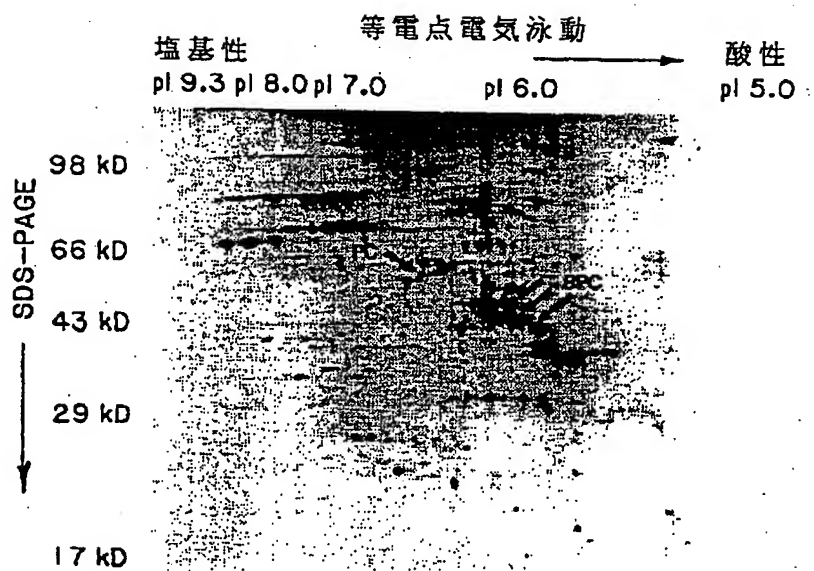


FIG. 1C

【図2】

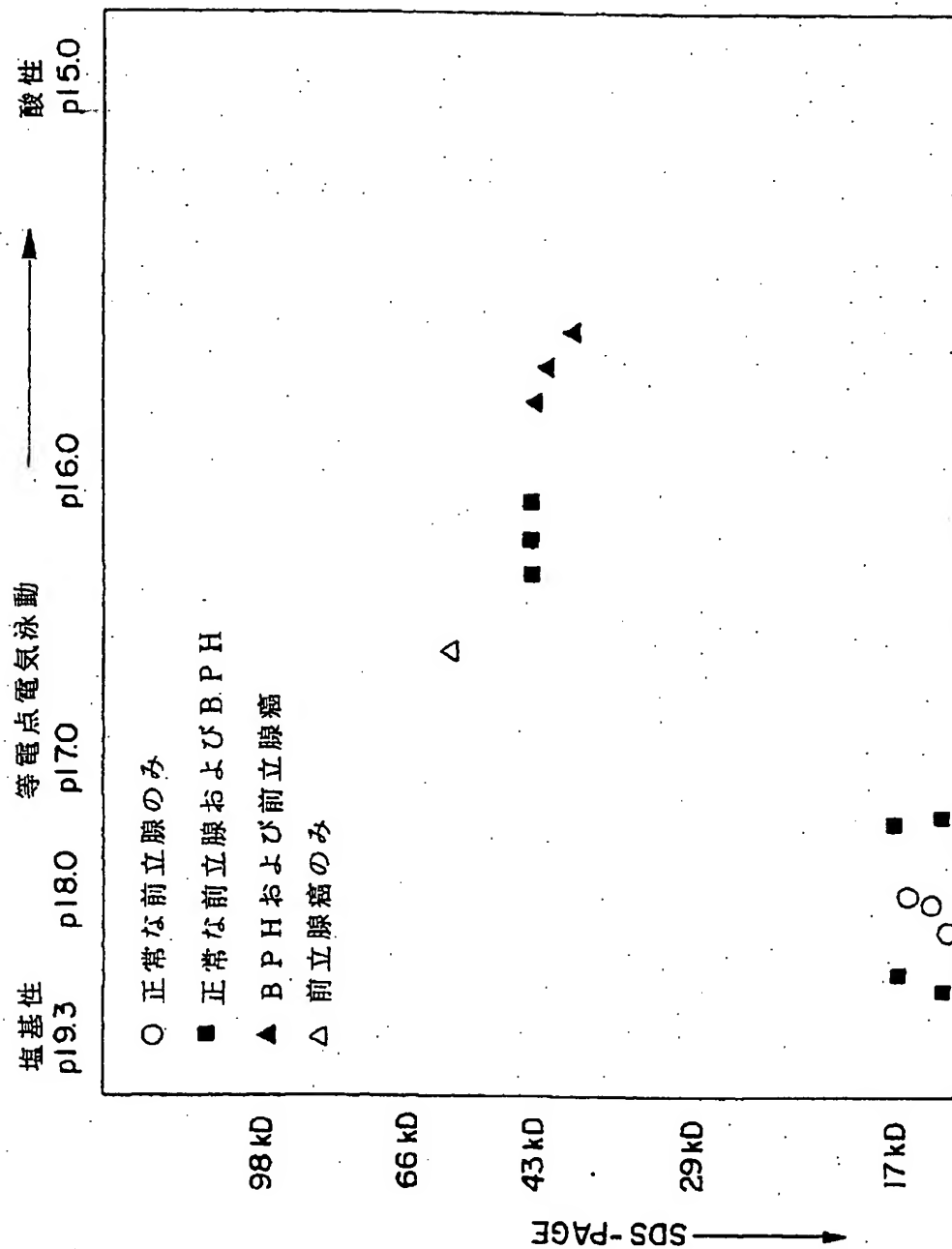


FIG. 2

【図3】

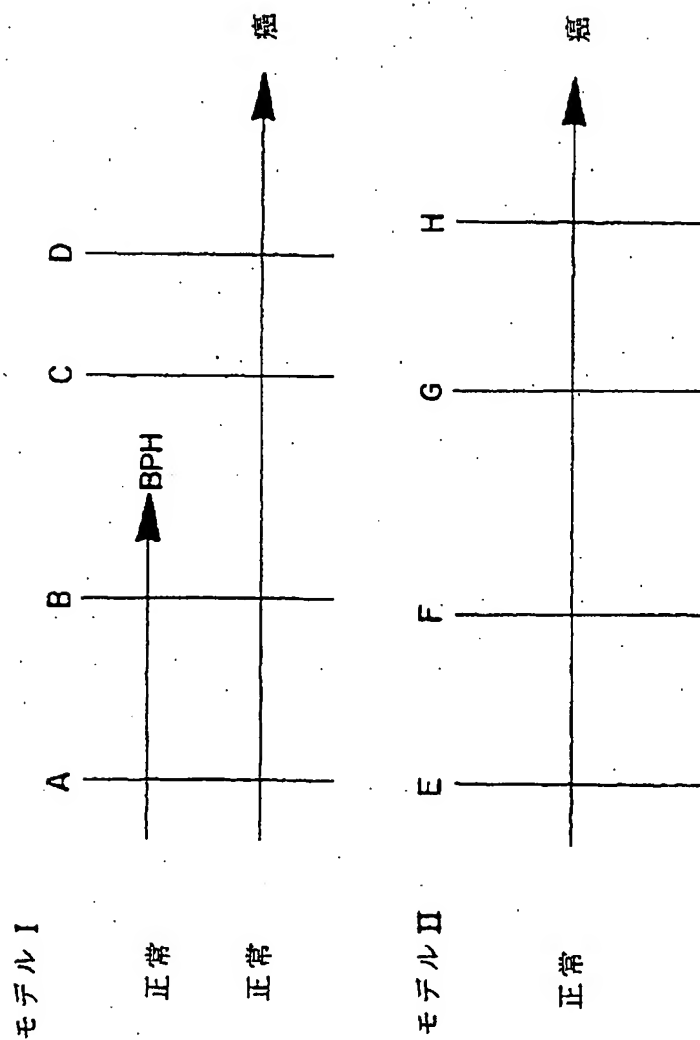


FIG.3

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US94/01360

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(S) : C07H 21/04, 21/02; C07K 13/00; C12Q 1/68 US CL : 536/24.1, 22.1; 530/350; 435/6 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/24.1, 22.1; 530/350; 435/6 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, BIOSIS, CAS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Cancer Research, Volume 51, issued 1991, Getzenberg et al., "Identification of nuclear matrix proteins in the cancer and normal rat prostate", pages 6514-6520, see pages 6515-6517.	1-11, 60-63
Y	J. Chromatography, Volume 569, issued 1991, Cupo, "Electrophoretic analysis of nuclear matrix proteins and the potential clinical applications", page 389-406, see entire document.	1-59
Y	Biochem. Biophys. Res. Comm., Volume 179, No. 1, issued 30 August 1991, Getzenberg et al., "Modifications of the intermediate filament and nuclear matrix networks by the extracellular matrix", pages 340-344, see pages 340-342.	12-69
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 APRIL 1994		Date of mailing of the international search report APR 20 1994
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Jeff Warden for</i> EGGERTON CAMPBELL Telephone No. (703) 308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

L. National application No.

PCT/US94/01360

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Cancer research, Volume 52, issued 1992, Miller et al., "Detection of nuclear matrix proteins in serum from cancer patients", pages 422-427, see entire document.	38-48
Y	Gene, Volume 33, issued 1985, Yanisch-Perron et al., "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors", pages 103-119, see entire document.	12-55

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 0 7 K 14/435		8517-4H	C 0 7 K 14/435	
	14/82	8517-4H		14/82
C 1 2 N 1/21		8828-4B	C 1 2 N 1/21	
	5/10	9358-4B	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08		9453-4B	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		8310-2 J	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53		8310-2 J		33/577
	33/577	9281-4B	C 1 2 N 5/00	B
(72) 発明者	バーティン, アラン ダブリュー			
	アメリカ合衆国 21236 メリーランド州			
	バルチモア, ヘッジフォードコート 7			
	番地			
(72) 発明者	ゲツェンバーク, ロバート エイチ			
	アメリカ合衆国 06405 コネティカット			
	州 プランフォード グリーンス ファー			
	ム ロード 244番地			

English translation of  
Notice of Reasons for Rejection

Japanese Patent Application No.: Hei10-542849

Your Ref.: 076333/0176

Our Ref.: LF-111

1/3

Notice of Reasons for Rejection  
(Translation)



Drafting Date: May 29, 2007  
Dispatch Date: June 5, 2007  
Sections Applied: 29 main paragraph, 29(2) and 36

-----  
This application is rejected for the reasons stated below. If the Applicant has any arguments against the reasons, such arguments should be submitted within three months from the dispatch date of this *Notice of Reasons for Rejection*.

**Rejections**

1. The inventions claimed in the following claims are not patentable under Japanese Patent Law Section 29(2), because they could have been easily made by a person with ordinary skill in the art to which the present invention pertains, prior to the filing of this application, on the basis of the inventions described in the documents listed below, which were distributed in or outside of Japan, prior to the filing of this application.
2. The inventions claimed in the following claims are not patentable because they fail to comply with the requirements under Japanese Patent Law Section 29(1), main paragraph, due to the reasons stated below.
3. The detailed description of the invention of this application fails to comply with the requirements under Japanese Patent Law Section 36(4), for the reasons mentioned below.

**Reasons (Regarding the cited documents, see List of Cited Documents)**

Rejections: 1

Claims: 1-28 and 43-46

Cited Documents: 1-3

Remarks:

Cited Document 1 describes two interior nuclear matrix proteins useful as markers of malignant cell types and the genes encoding the proteins. Further, the document discloses that the protein-specific antibodies or the like are produced and an abnormal cell type in the bladder and the like are detected (Specifically, Claims 11-19 and Claims 24-28).

Cited Document 2 describes that a nuclear matrix protein fraction was purified from a specific cell, the purified product was separated by high resolution two-dimensional gel electrophoresis, the protein spots between tissues were compared, and a nuclear matrix protein specifically expressed in specific tissues such as prostate cancer was isolated.

Cited Document 3, a paper from the applicants of the present application, describes that the nuclear matrix proteins were extracted from tumor tissues and normal tissues of 17 bladder cancer patients, and subjected to high resolution two-dimensional gel electrophoresis to obtain nuclear matrix proteins (BLCA1-6) that are specifically expressed in bladder cancer.

It is understood that developing an early diagnosis method for renal cancer and obtaining marker molecules that are specifically expressed in renal cancer were the problems to be solved at the time of filing the present application. Further, it is understood that it would have been already well known techniques at the time of filing the present application to obtain a nuclear matrix protein that is specifically expressed in certain cancer tissues and a polynucleotide encoding the protein and to detect cancer in certain cancer tissues by using antibodies and the like which bind against the protein (see cited Documents 1-3, if needed).

Accordingly it is understood that, for the purpose of solving the above mentioned problems, it would have been obvious for those skilled in the art to obtain a nuclear matrix protein that is specifically expressed in renal cancer and a polynucleotide encoding the protein by applying the above-described well known techniques to tumors and normal renal tissues derived from patients with renal cancer. It would have also been obvious to obtain an antibody and such which bind against the protein and to detect renal cancer. Further it is understood that providing a kit is a common practice for the skilled person.

Therefore, it would be obvious for one skilled in the art to arrive at the invention of the above mentioned claims based on the description of Cited Documents 1 to 3.

Rejections: 2

Claims: 29-38

Remarks:

The inventions of claims 29-38 are regarded as methods for treating humans. Thus, they are not industrially applicable inventions.

Rejections: 3

Remarks:

- (1) The amino acid sequences of the proteins and the nucleotide sequences of



the polynucleotides of the inventions of Claims 1-43 are not described. Even if considering the common technical knowledge at the time of filing the present application, it remains unknown about how the skilled person could provide such products.

Further, it is understood that one skilled in the art would not be able to provide such products without excessive trial and error.

Therefore, the detailed description of the invention is not described in a manner sufficiently clear and complete for the inventions of Claims 1-43 to be carried out by a person skilled in the art.

(2) With respect to the phrase "blocks or enhances the function of an NMP" in Claims 39-42, there are no specific descriptions about the function of the NMP, specifically, RCCA-1, RCCA-2, RCCA-3, RCCA-4, RCCA-5 and RCNL-1, in the detailed description of the invention. It is not known how the functions can be measured. Thus, it is understood that, without excessive trial and error, one skilled in the art would not be able to identify compositions that blocks or enhances such unknown function of NMP.

Therefore, the detailed description of the invention is not described in a manner sufficiently clear and complete for the inventions of Claims 39-42 to be carried out by a person skilled in the art.

#### **List of Cited Documents**

1. Japanese Patent Kohyo Publication No. (JP-A) H07-509602 (unexamined Japanese national phase publication corresponding to a non-Japanese international publication)
2. Japanese Patent Kohyo Publication No. (JP-A) H08-508396 (unexamined Japanese national phase publication corresponding to a non-Japanese international publication)
3. Cancer Res., (1996), vol.56, no.7, p.1690-1694

---

#### **Record of Prior Art Search Results**

*This record is not a component of the reasons for rejection.*

- Prior art references:

発送番号 263101 1/  
 発送日 平成19年 6月 5日

拒絶理由通知書

特許出願の番号	平成10年 特許願 第542849号
起案日	平成19年 5月29日
特許庁審査官	福間 信子 3539 4B00
特許出願人代理人	清水 初志 (外 1名) 様
適用条文	第29条柱書、第29条第2項、第36条

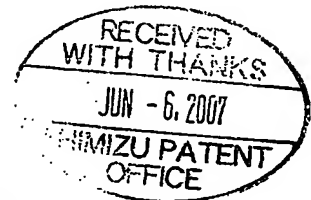
この出願は、次の理由によって拒絶をすべきものである。これについて意見があれば、この通知書の発送の日から3か月以内に意見書を提出して下さい。

理 由

1. この出願の下記の請求項に係る発明は、その出願前に日本国内又は外国において頒布された下記の刊行物に記載された発明に基いて、その出願前にその発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者が容易に発明をすることができたものであるから、特許法第29条第2項の規定により特許を受けることができない。

記

引用例1：特表平7-509602号公報  
 引用例2：特表平8-508396号公報  
 引用例3：Cancer Res., (1996), vol.56, no.7, p.1690-1694



- ・請求項 1-28, 43-46
- ・理由 1
- ・引用例 1-3
- ・備考

引用例1には、悪性細胞型のマーカーとして有用な二種の内部核マトリックスタンパク質及び該タンパク質をコードする遺伝子が記載されている。そして、該タンパク質に対する抗体等を作成し、膀胱等の悪性細胞型を検出する方法が記載されている（特に、請求項11-19及び請求項24-28）。

引用例2には、特定の細胞から核マトリックスタンパク質画分を精製し、高分解能2次元ゲル電気泳動により分離し、組織間のタンパク質スポットの比較を行い、前立腺癌といった特定の組織に特異的に発現する核マトリックスタンパク質を分離したことが記載されている。

引用例3は、本願出願人らによる論文であるが、膀胱癌の17人の患者から腫瘍

と正常な癌組織を取得し、これらの組織から核マトリックスタンパク質画分を抽出して高分解能二次元電気泳動を行い、膀胱癌に特異的に発現している核マトリックスタンパク質（BLCA1-6）を取得したことが記載されている。

ところで、腎癌の早期検出方法を開発することや該方法に使用する腎癌特異的に発現しているマーカー分子を取得することは、本願出願当時自明の課題であったと認める。また、ある癌組織特異的に発現している核マトリックスタンパク質に着目し、該タンパク質や該タンパク質をコードするポリヌクレオチドを取得する手法や該タンパク質に対応する抗体等を用いて、ある組織に特異的な癌を検出する方法は、本願出願当時周知技術であったと認める（要すれば、引用例1-3参照）。

そうすると、上記課題を解決する目的で、腎癌の患者由来の腫瘍と正常な腎組織に対し、上記周知技術を適用し、腎癌に特異的に発現している核マトリックスタンパク質及び該タンパク質をコードするポリヌクレオチドを取得すること、対応する抗体等を取得し、腎癌の検出を行うことは、当業者が容易に想到し得るものと認める。また、キット化することは、当業者の常套手段であると認める。

よって、上記請求項に係る発明は、引用例1-3記載の発明に基づいて、当業者が容易に想到し得たものと認められる。

2. この出願の下記の請求項に係る発明は、下記の点で特許法第29条第1項柱書に規定する要件を満たしていないので、特許を受けることができない。

#### 記

・請求項 29-38

・理由 2

請求項29-38に係る発明は、いわゆる人間を治療する方法の発明であると認められ、産業上利用することができる発明に該当しない。

3. この出願は、発明の詳細な説明の記載が下記の点で、特許法第36条第4項に規定する要件を満たしていない。

#### 記

(1) 請求項1-43に係る発明のタンパク質、ポリヌクレオチドは、そのアミノ酸配列、塩基配列が記載されておらず、本願出願当時の技術常識を考慮しても、当業者がこれらの物をどのようにしてつくることができるのか不明である。また、そのような物をつくるためには、当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を要するものと認める。

発送番号 263101 3/E

発送日 平成19年 6月 5日

よって、この出願の発明の詳細な説明は、当業者が請求項1-43に係る発明を実施することができる程度に明確かつ十分に記載されていない。

(2) 請求項39-42の「NMPの機能をブロックまたは増強させるか」について、NMP、具体的にはRCCA-1、RCCA-2、RCCA-3、RCCA-4、RCCA-5およびRCNL-1の機能について、本願の発明の詳細な説明には具体的に何ら記載されておらず、どのようにして該機能を測定することができるのか不明であり、また、そのように不明なNMPの機能をブロックまたは増強する組成物を同定するためには、当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を要するものと認める。

よって、この出願の発明の詳細な説明は、当業者が請求項39-42に係る発明を実施することができる程度に明確かつ十分に記載されていない。

---

#### 先行技術文献調査結果の記録

・調査した分野 I P C C12N 15/00-90  
D B 名 PubMed、BIOSIS/WPIDS(STN)

この先行技術文献調査結果の記録は、拒絶理由を構成するものではない。

この拒絶理由通知の内容に関するお問い合わせがございましたら下記までご連絡下さい。

特許審査第三部 生命工学 福間信子

TEL. 03 (3581) 1101 内線3487

FAX. 03 (3501) 0491